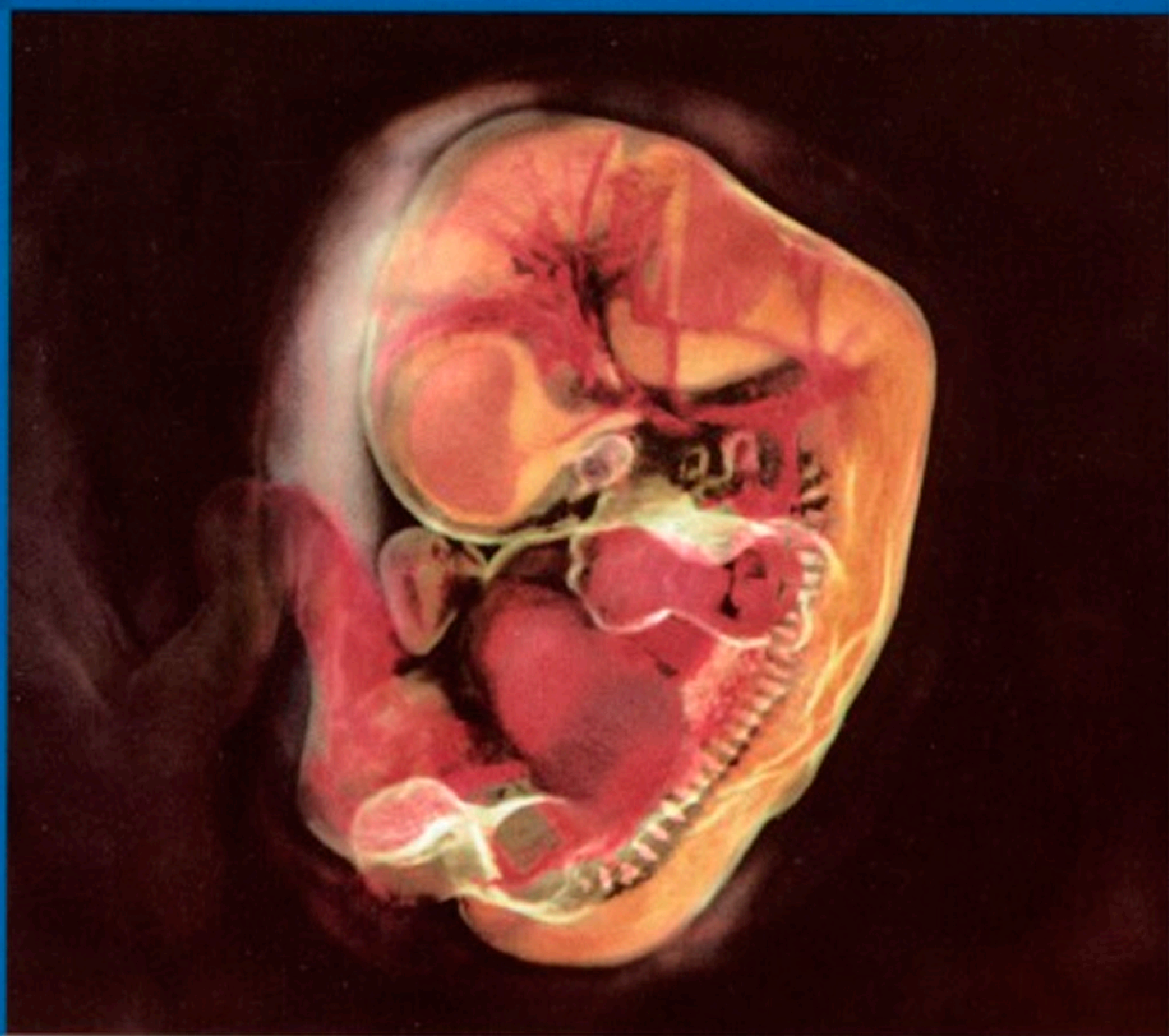
Gilbert

Biología del Desarrollo

7.ª EDICIÓN





Incluye
vade mecum
CD-ROM con
una guía interactiva

EDITORIAL MEDICA
panamericana

Título del original en inglés
DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 7th edition

Traducción y supervisión
EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.
efectuada por el doctor José Luis Eduardo Ferrán: Becario posdoctoral (Fundación Carolina) Departamento de Anatomía Humana y Psicología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.



Visite nuestra página web:
http://www.medicapanamericana.com

ARGENTINA
Marcelo T. de Alvear 2145 (C1122AAG) - Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821-5520 / 2066 / Fax (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA
Carrera 7a A Nº 69-19 - Santa Fe de Bogotá DC.
Tel.: (57-1) 235-4068 / Fax: (57-1) 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA
Alberto Alcocer 24 (28036) - Madrid, España
Tel.: (34)91 1317800 / Fax: (34)91 1317805
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO
Calzada de Tlalpan Nº 5022 entre Tezoquipa y Michoacán
Colonia La Joya - Delegación Tlalpan - 14090 - México D.F.
Tel.: (52-55) 5573-2300 / Fax: (52-55) 5655-0381
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA
Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6-C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador - Caracas
Depto. Capital
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666 Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN 950-06-0869-3
84-7903-912-4

COEDICIÓN IMPRESA EN ESPAÑA



Gilbert, Scott F.
Biología del Desarrollo: con CD-ROM: 7a ed. - Buenos Aires: Médica Panamericana, 2005
902 p. ; 28×20 cm

Traducido por: José Luis Ferrán

ISBN 950-06-0869-3

1. Desarrollo Embrionario - Biolgía. I. Ferrán, trad. II. Título
CDD612.6: 571.8

Depósito legal: M-17.882-2005

Índice resumido

Parte I Principios de la biología del desarrollo

Parte II Desarrollo embrionario temprano

Parte III Desarrollo embrionario tardío

Parte IV Ramificaciones adicionales de la biología del desarrollo

Índice

Parte I Principios de la biología del desarrollo

CAPÍTULO 8 *Desarrollo temprano en invertebrados seleccionados* 239

CAPÍTULO 9 *La genética de especificación del eje en* Drosophila 285

CAPÍTULO 10 *Desarrollo temprano y formación del eje en anfibios* 329

Parte IV Ramificaciones adicionales de la biología del desarrollo

CAPÍTULO 20 *Una perspectiva general sobre el desarrollo de las plantas 695*

CAPÍTULO 21 *Implicaciones médicas de la biología del desarrollo 729*

CAPÍTULO 22 *Regulación ambiental del desarrollo animal 771*

Prefacio

Jean Rostand, el embriólogo y ensayista francés escribió: "Hoy mi libro está hecho. ¿Se hará mañana?" La respuesta, por supuesto, es "¡De ningún modo en la biología del desarrollo!". La biología del desarrollo todavía no puede mantenerse quieta por un momento; las nuevas ideas y explicaciones han llevado nuestro conocimiento hasta el límite. Si usted busca los desafíos intelectuales de los nuevos conceptos que están surgiendo, es el lugar para hacerlo. En la biología del desarrollo hay una doble revolución y esta obra es un documento de ello.

La primera fase de la revolución comenzó en la década de 1970. En esa época, la biología del desarrollo empezó a hacer uso de las nuevas tecnologías del DNA recombinante para explicar cómo la genética especificaba los fenotipos compuestos de diferentes tipos de células y órganos. Éste sigue siendo uno de sus principales proyectos. La primera edición de este libro (1985) fue escrita en respuesta al comienzo de esta revolución. Aunque no se mencionó casi ningún gen en aquella edición, se describieron las técnicas de clonación del DNA y se aludió al primer trabajo del laboratorio de Nüsslein-Volhard. En la segunda edición (1988) se incluyeron los genes homeobox, los potenciadores y promotores, y la hibridación in situ estaba en su tapa. Los factores de transcripción hicieron su aparición en la tercera edición (1991) y en la cuarta (1994) se detallaron los factores paracrinos. Las ediciones posteriores se dedicaron a las vías de señales de transducción que relacionan los factores paracrinos con los factores de transcripción. Esta ciencia nueva reconocida identificó los mecanismos moleculares de la mayor parte de los procesos centrales de la biología del desarrollo: diferenciación e inducción.

Durante ese tiempo comenzó la segunda fase de la revolución. La biología del desarrollo buscó abrirse hacia otros campos y ampliar las técnicas de DNA recombinante e incluso tecnologías más nuevas (bioinformática y genómica) para acercarse a las áreas que había abandonado durante su evolución. Hay cuatro campos de expansión y reconciliación: evolución, embriología, ecología y medicina.

Nosotros hemos regresado a la biología evolutiva (tal como Wilhelm Roux predijo que lo haríamos) con un nuevo paradigma para los mecanismos causales de la evolución, entendiendo la evolución como cambios en la expresión génica, así como cambios en la frecuencia de los alelos. La tercera edición inauguró el capítulo sobre biología del desarrollo evolutiva. La biología del desarrollo también había abandonado las preguntas sobre morfogénesis en embriología, pensando que esto era, en su mayor parte, un subgrupo de expresión génica diferencial. Ahora estamos regresando a esta área con nuevas herramientas moleculares e informáticas para analizar los mecanismos celulares que posibilitan la organogénesis y las restricciones matemáticas que permiten que solo se produzca un fenotipo. La cuarta edición (1994) destacó estas inquietudes. Además, a medida que los mecanismos genéticos subyacentes, como las preguntas morfogenéticas sobre la especificación de ejes, empiezan a ser aclarados, la ubicuidad de mecanismos similares se hace evidente. Aun la morfogénesis de las plantas, considerada durante mucho tiempo muy diferente del desarrollo animal para constituir casi un campo separado, ha llegado a ser parte de esta nueva intercalación de la biología del desarrollo. La sexta edición (2000) vio el agregado de un nuevo capítulo sobre el desarrollo de las plantas.

Algunos de los embriólogos experimentales se interesaron en la plasticidad del desarrollo y en cómo éste era modificado por el ambiente. Actualmente estamos llevando a la biología del desarrollo a interesarse sobre aspectos de la ecología. Esta biología ecológica pretende hallar las causas para las estrategias de la historia de la vida bien conocidas por los ecologistas. La quinta edición (1997) inauguró nuestro capítulo sobre biología del desarrollo ecológica.

Muchas de las investigaciones tempranas de la embriología experimental se llevaban a cabo con el objetivo de descubrir los mecanismos de las anomalías del desarrollo. Después de una larga ausencia, la biología del desarrollo, con sus nuevas herramientas y aproximaciones, está reclamando su herencia médica. Estamos identificando las causas de las malformaciones hereditarias, buscando los caminos por los cuales los químicos exógenos alteran el desarrollo normal y estudiando curaciones para estas anomalías. La edición actual inaugura el capítulo sobre las implicaciones médicas de la biología del desarrollo.

"Explorando nuevos mundos extraños"

Se escribió un nuevo capítulo sobre las implicaciones médicas de la biología del desarrollo. Las historias aparecen a diario en los periódicos: clonación, células madre, ingeniería genética, fecundación in vitro, tratamientos para el cáncer, regeneración de órganos y protocolos para prolongar la vida. En los últimos cinco años, la biología del desarrollo ha usurpado el lugar ocupado por la ciencia ficción. Nuestro conocimiento nos ha permitido transformar los hígados en páncreas y convertir el pico puntiagudo de la codorniz en un pico aplanado de pato; así como clonar gatos y colocar nuevos genes en las células madre embrionarias humanas. Esta capacidad para entender e incluso transformar la naturaleza es revolucionaria. Una década atrás ni siquiera podía soñarse algo así. La biología detrás de los titulares casi nunca es

informada en los medios y de algún modo es tan fascinante como las tecnologías que derivan de ella. Además, estas tecnologías están llevando a la biología del desarrollo hacia la esfera social como nunca lo había estado antes. Los estudiantes de biología del desarrollo deberían ser capaces de explicarles a sus compañeros de clase (y padres) la ciencia detrás de las historias de las noticias, y espero que este capítulo facilite esta transmisión. También creo que los biólogos (los ya formados y los que están surgiendo) necesitan pensar sobre las consecuencias de nuestra investigación.

Junto con esta revolución en biología del desarrollo ha tenido lugar la revolución en la tecnología de la información. Ambas se han integrado y han facilitado en gran medida la fusión de la biología del desarrollo con la ecología, la evolución y la medicina. Esta influencia también se observa en el libro. *Biología del desarrollo* puede haber sido el primer texto de ciencia en tener un sitio web (en 1994), y en esta edición, devbio.com se ha expandido para incluir un volumen entero sobre los aspectos éticos de la biología del desarrollo. Estos podrían funcionar como puntos de partida de discusiones en el laboratorio mientras esperamos que corran los geles o que se corten los embriones.

El CD ***Vade Mecum*** ha experimentado su propia metamorfosis y se ha conectado integralmente aún más con el libro. No solo ha expandido su alcance; también ha incorporado un manual entero del laboratorio. Así como ésta es la primera edición del libro en la que se integran las diversas áreas de la biología del desarrollo, también es la primera en la que se incluye un manual de laboratorio y un folleto sobre bioética en sus incorporaciones electrónicas.

Ésta es la primera edición del libro que ha reunido todas estas ramas y espero que se haga justicia con la biología del desarrollo y con la revolución que está cambiando nuestras vidas profesionales y personales. Sin embargo, durante toda esta revolución siempre se ha retornado al embrión. Él es la fuente de nuestra curiosidad y de nuestro temor. Algunos de nosotros somos bastante afortunados en poder ganarnos la vida pensando sobre ellos e incluso yendo al laboratorio para confirmar nuestras teorías. Como Jean Rostand proclamó, "Qué profesión es ésta; es una inhalación diaria de asombros".

Agradecimientos

Esta edición, como las versiones anteriores, se ha nutrido de los estudiantes de mis clases de embriología y de genética del desarrollo. La mayor parte del sitio web sobre bioética fue recopilada por estudiantes en mi curso de historia de la biología. El libro recibió la ayuda de un personal extraordinario de apoyo y de la facultad del Swarthmore College. Esto incluye a los bibliotecarios, los asistentes administrativos, el personal de correo y los especialistas en computadoras, así como al personal académico y de la facultad. También deseo agradecer a los científicos que me dieron el permiso para utilizar sus maravillosas figuras y fotografías, y también a los que enviaron correcciones y sugerencias para esta edición. No hay mejor cumplido que el que alguien invierta su tiempo en recorrer el libro y señalar las cosas que se pueden hacer mejor. Charles Bieberich y Andrew Whipple brindaron una ayuda invalorable.

Estoy nuevamente en deuda con muchos colegas que revisaron las versiones iniciales de estos capítulos en busca de errores y que me condujeron hacia nuevos e importantes trabajos de investigación que habían sido hechos en sus respectivas especialidades. Kathryn Anderson, Adam Antebi, Bruce Baker, Hans Bode, Donald Brown, Ann Burke, Blanche Capel, Judy Cebra-Thomas, Eddie De Roberts, Charles Emerson, John Fallon, David Gardiner, Laurinda Jaffe, Ray Keller, Marta Laskowski, Kirsti Linask, David McClay, Anthony-Samuel Lamantia, Philip Meneely, Mary Montgomery, Lisa Nagy, Fred Nijhout, John Opitz, Rudy Raff, Kirsi Saino, Hannu Sariola, Gary Schoenwolf, Billie Swalla, Carl Thummel, Kathy Tosney, Rocky Tuan, Mary Tyler, Adam Wilkins, Christopher Wright y Christopher Wylie, todos proporcionaron un aporte muy valioso, incluyendo a menudo trabajos científicos y bocetos de figuras mejoradas: ¡el tipo más concreto de ayuda que un autor puede pedir! Los errores que persisten son solo míos.

Mis editores, Andy Sinauer y Carol Wigg, guiaron el proyecto hacia una realización exitosa mientras que de algún modo (al menos hasta lo que puedo saber), mantenían su sensatez. El personal de producción de Sinauer, incluidos Chris Small, Jefferson Johnson, Janice Holabird y Joanne Delphia emplearon los mágicos usos del software de publicación digital moderna para diseñar y producir las páginas, hacer los cambios y actualizar las modificaciones hasta que el libro "diera con la imprenta." Fraser Tan proporcionó el apoyo de las pruebas de corrección para un autor con prisa. Y como siempre, mi agradecimiento a Anne Raunio por su ayuda dentro del capítulo médico y especialmente por reunirse conmigo todo el año pasado.

SCOTT GILBERT

Prólogo

La Biología del desarrollo es uno de los campos de interés científico más atractivos del momento, dada la feliz conjunción de grandes adelantos técnicos y conceptuales. Éstos permiten en la actualidad un gran salto cualitativo y cuantitativo en la descripción, análisis y explicación causal de los procesos del desarrollo embrionario de los animales y plantas. En particular, la conjunción de la biología molecular y la genética con la clásica embriología descriptiva y experimental –dando lugar al extenso campo de conocimiento que hoy conocemos como "biología del desarrollo"– está rindiendo frutos muy interesantes a ritmo creciente. Está, ya, en franca expansión la aplicación práctica de estos conocimientos en biomedicina y producción de alimentos, vislumbrándose una nueva revolución industrial sobre estas bases.

La aproximación denominada "Evo-Devo" (conjunción de análisis evolutivo, genético-molecular y embriológico comparado) está abriendo nuevas perspectivas de comprensión de las relaciones evolutivas entre los distintos seres vivos sobre la Tierra, así como de los complejos mecanismos moleculares y celulares que estabilizan la morfogénesis de los organismos (morfostasis; morfotipo), sin bloquear por ello su variación y evolución continuadas. El aprovechamiento científico del código genético común y de la tendencia conservativa de la herencia genómica ha logrado extender el posible significado y correlato causal de cada mecanismo molecular deducido en una especie cualquiera al conjunto de los seres vivos, amplificando así enormemente la utilidad de cada avance. Hemos comenzado a ver recientemente la descripción del genoma entero de diversos organismos. Ello conlleva, apoyándonos en los nuevos recursos bioinformáticos y los avances en biología del desarrollo, unas posibilidades inmensas para su aprovechamiento en la resolución de problemas de la humanidad. No cabe duda de que, con acierto o sin él, caminaremos por esta senda, y la consecuente transformación social global parece inevitable (avances en bioética).

El libro que aquí se presenta –*Biología del desarrollo* de Scott F. Gilbert– defiende convincentemente el punto de que, para avanzar adecuadamente en todos estos frentes, no basta con los adelantos tecnológicos, la pluralidad de modelos animales y la bioinformática genética. Se precisa, además, una comprensión general adecuada de los procesos del desarrollo en sus diferentes niveles de complejidad (molecular, celular, tisular, organísmico). Ello se debe en esencia a que el desarrollo (visto como cambio estructural, fenotípico) no ocurre separadamente de la función, ya sea del organismo en su conjunto (embrión, joven o adulto), que está vivo y por tanto es funcional, o de cualquiera de sus partes constituyentes en la jerarquía de niveles de complejidad ya mencionada. Es un complejísimo sistema dinámico de equilibrios el que pretendemos conocer –el mismo eje de la vida en continua adaptación y evolución– y no es posible someterlo a una reducción conceptual excesivamente drástica (bolas verdes y rojas en un tubo de ensayo). A cada nivel de complejidad debemos preparar modelos suficientemente detallados para que los significados de los datos no se nos deslicen entre los dedos. El embriólogo en ciernes deberá desarrollar una sensibilidad exquisita para valorar el nivel de complejidad que centra su atención, sin perder de vista cuáles son sus correlatos inmediatos en los órdenes de magnitud superior e inferior. Una mínima perspectiva comparada es inexcusable, incluso más allá de la división entre animales vertebrados e invertebrados (el libro aporta un recomendable capítulo sobre desarrollo de las plantas).

Versión traducida de forma excelente al español de la séptima edición inglesa original, el "Gilbert" será sin duda bien recibido entre los universitarios interesados en este campo (biólogos, veterinarios, médicos, bioquímicos, farmacéuticos). Es una obra bien conocida y apreciada, dimensionada hábilmente en la frontera del libro de texto y el libro de referencia; la puesta al día hasta el año 2003 es por ello un atractivo importante.

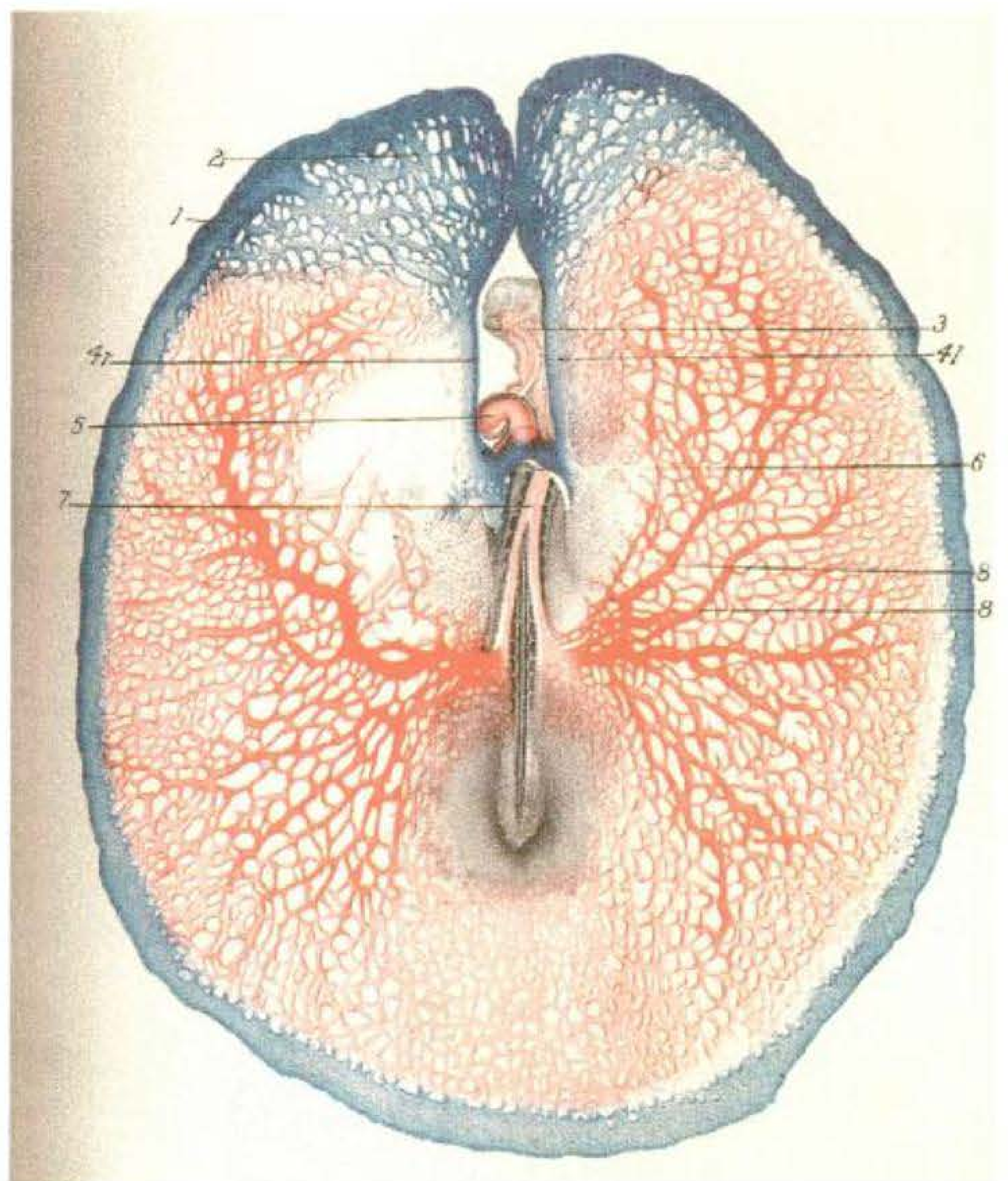
El plan de la obra consta de un cuerpo principal en cuatro partes, cada una con varios capítulos ilustrados de manera extensa (hasta un total de 23 capítulos). La primera parte "Principios de la biología del desarrollo" establece en 6 capítulos las bases históricas, biológicas, genéticas y celulares del campo a estudiar, incidiendo particularmente sobre las modernas técnicas experimentales utilizadas y el significado esencial de la expresión génica diferencial y la comunicación intercelular. La segunda parte "Desarrollo embrionario temprano" trata en cinco capítulos la fertilización y el desarrollo temprano (formación del eje corporal) en modelos de invertebrados, anfibios, peces, aves y mamíferos, y establece las bases para su comparación mutua. La tercera parte "Desarrollo embrionario tardío" aborda en sus primeros cuatro capítulos la derivación de órganos o partes embrionarias a partir del ectodermo, cresta neural, mesodermo y endodermo, y continúa a través de otros cuatro capítulos con temas más específicos (desarrollo de los miembros en los tetrápodos, determinación del sexo, metamorfosis y otros procesos plásticos, línea germinal). Finalmente, la cuarta parte "Ramificaciones adicionales de la biolo-

gía del desarrollo" cubre en cuatro capítulos el desarrollo de las plantas, las implicaciones médicas de la biología del desarrollo, los efectos ambientales sobre el desarrollo animal y los mecanismos ontogenéticos del cambio evolutivo. Todo este discurso está salpicado oportunamente con 36 apartados aclaratorios denominados "aspectos colaterales y especulaciones", también ilustrados con imágenes, y cada capítulo presenta al final un resumen de conclusiones y una bibliografía extensa. Las ilustraciones, en su mayoría en color, están seleccionadas muy cuidadosamente y justifican por sí solas el examen de la obra. Aparte de los numerosos esquemas o dibujos de artista que representan diversos mecanismos del desarrollo, se recogen también gran número de fotografías extraídas de la literatura científica más reciente. Este acervo de imágenes se ve aún ampliado por el aporte de un CD con unos 140 videos, 300 fotografías adicionales anotadas y un manual de laboratorio, y la existencia de una página en red específica (www.devbio.com) que aporta actualizaciones de utilidad didáctica y desarrolla algunos temas de bioética.

No sorprendo a nadie opinando que "el Gilbert" representa una excelente introducción a la Biología del Desarrollo y a la vez es de lectura casi obligada para los profesionales que quieran mantenerse o ponerse al día en embriología. Si bien éstos encontrarán que, debido al carácter general de la obra, Gilbert no desarrolla "su tema" con la extensión y profundidad de un tratamiento especializado, la riqueza de nuevos datos sobre el conjunto de temas, y las nuevas correlaciones conceptuales establecidas entre unos y otros bien valen la relectura. Uno no puede evitar sentirse fascinado por los contenidos intelectuales explícitos e implícitos en esta obra. En este sentido se trata de algo más que de un texto de biología del desarrollo: es una auténtica escuela de pensamiento en este campo.

LUIS PUELLES
Catedrático de Neuroanatomía
Universidad de Murcia

Parte I Principios de la biología del desarrollo



Embrión de pollo de dos días visto desde la superficie ventral, que permite observar la circulación de la sangre hacia el saco vitelino y hacia atrás. La sangre abandona el embrión a través de dos arterias vitelinas, y ésta retorna mediante las venas vitelinas cerca de la cabeza del embrión. (Figura. 1-2B de F. R. Lillie, 1908.)

Capítulo 1 Biología del desarrollo: la tradición anatómica

La naturaleza es siempre la misma, y aun su apariencia es siempre cambiante. Éste es nuestro negocio como artistas para transmitir la emoción de la permanencia de la naturaleza junto con los elementos y las apariencias de todos sus cambios.

PAUL CEZANNE
(alrededor de 1900)

Las grandes mentes progresistas de la embriología no han buscado la hipótesis; ellas han observado embriones.

JANE OPPENHEIMER (1955)

ENTRE LA FECUNDACIÓN Y EL NACIMIENTO, el organismo en desarrollo se conoce como embrión. El concepto de un embrión es asombrosamente único, y la formación de un embrión es el acontecimiento más difícil que alguna vez podrías llevar a cabo. Para llegar a ser un embrión, tienes que construirte a tí mismo a partir de una única célula. Tienes que respirar antes de tener pulmones, digerir antes de poseer un tubo digestivo, construir huesos cuando eras pulposo y formar series de neuronas dispuestas ordenadamente antes de saber pensar. Una de las diferencias críticas entre tú y una máquina es que no se necesita del funcionamiento de ésta hasta que está construida. Cada animal debe funcionar mientras se construye a sí mismo.

Para los animales, hongos y plantas, el único camino para alcanzar el estado adulto partiendo de una célula huevo o cigoto es mediante el desarrollo de un embrión. El embrión media entre el genotipo y el fenotipo, entre los genes heredados y el organismo adulto. Mientras que la mayor parte de la biología estudia la estructura y función del adulto, la biología del desarrollo encuentra más interesante el estudio de los estados transitorios que lo preparan para el adulto. La biología del desarrollo estudia el comienzo y la construcción de un organismo más que su mantenimiento. Es una ciencia de llegar a ser, una ciencia de procesos. Decir que la mosca de mayo (efímera) vive tan solo un día es profundamente impreciso para un biólogo del desarrollo. Una mosca de mayo puede ser un adulto alado por tan solo un día, pero ésta pasa otros 364 días de su vida como un juvenil acuático bajo las aguas de una charca o de un arroyo.

Las preguntas que a menudo se hacen los biólogos del desarrollo son acerca de llegar a ser más que sobre ser. Para un biólogo del desarrollo decir que los mamíferos XX son generalmente femeninos y que los mamíferos XY son generalmente masculinos no explica la determinación del sexo, debido a que él quiere saber *cómo* el genotipo XX produce una hembra y *cómo* el genotipo XY produce un macho. Del mismo modo, un genetista podría preguntarse sobre cómo los genes de la globina son transmitidos desde una

* *Nota del traductor:* la palabra huevo (del inglés: *egg*) puede tener diferentes interpretaciones de acuerdo al contexto en que se la aplique, fundamentalmente para los textos publicados en inglés. En la presente obra se especificará el concepto de célula huevo o cigoto (resultado de la fusión de los gametos femenino y masculino), gameto femenino (que de acuerdo a la especie habrá o no finalizado la meiosis II), ovocito (en este caso estará refiriéndose a un gameto en proceso de diferenciación, gameto maduro (un concepto más amplio que se refiere a que el gameto se encuentra apto para ser fecundado) y óvulo. Solo se reservará la palabra huevo (inglés *egg*) para el caso en el que representa una etapa más amplia o que corresponde a la estructura dentro de la cual se llevará a cabo el desarrollo del embrión como es en el caso de las especies ovíparas. La palabra óvulo hace referencia al gameto que ha finalizado la meiosis II, pero debido a que en muchos casos el gameto femenino con capacidad fecundante no finaliza la meiosis II hasta que se produce la fecundación, se utilizará la palabra gameto femenino para evitar este tipo de confusión, reservándose el término óvulo para el caso que corresponda (ver más detalles en la fig. 7-5).

generación a la siguiente, y un fisiólogo podría preguntarse sobre la función de las proteínas de la globina en el cuerpo. Pero los biólogos del desarrollo se preguntan cómo es que los genes de la globina llegan a ser expresados solo en los glóbulos rojos de las células sanguíneas y cómo ellos llegan a ser activos únicamente en momentos específicos del desarrollo. (Todavía no conocemos las respuestas.)

La biología del desarrollo es un gran campo para los científicos que quieren integrar diferentes niveles de la biología. Se puede tener un problema y estudiarlo en los niveles molecular y químico (p. ej., ¿cómo se transcriben los genes de la globina? y ¿cómo hacen los factores que activan su transcripción para interactuar recíprocamente sobre el DNA?); en los niveles celular y tisular (¿cuáles son las células que tienen la habilidad de producir globina? y ¿cómo hace el mRNA de la globina para dejar el núcleo?); en los niveles de órganos y sistemas de órganos (¿cómo se forman los capilares en cada tejido? y ¿cómo son instruidos para ramificarse y conectarse?); y aún en los niveles ecológico y evolutivo (¿cómo pueden las diferencias en la activación del gen de la globina permitir al oxígeno circular desde la madre al feto? y ¿cómo los factores ambientales pueden desencadenar la diferenciación de más glóbulos rojos sanguíneos?).

La biología del desarrollo es uno de los campos más excitantes y de mayor crecimiento de la biología, creando una estructura que integra biología molecular, fisiología, biología celular, genética, anatomía, investigación en cáncer, neurobiología, inmunología, y ecología y biología evolutiva. El estudio del desarrollo se ha transformado en algo esencial para entender cualquier área de la biología.

Las preguntas de la biología del desarrollo

Según Aristóteles, el primer embriólogo conocido de la historia, la ciencia comienza con la admiración o el asombro: "Es debido a la admiración que el hombre empezó a filosofar, y la admiración sigue siendo el origen del conocimiento" (Aristóteles, *Metaphysics*, alrededor de 350 a.C.). El desarrollo de un animal a partir de una célula huevo ha sido origen de asombro a lo largo de la historia. El simple procedimiento de abrir un huevo de pollo durante cada día sucesivo de sus tres semanas de incubación proporciona una experiencia extraordinaria que permite observar cómo a partir de una delgada banda de células se llega a formar esta ave en su totalidad. Aristóteles llevó a cabo este procedimiento y prestó cuidadosa atención a la formación de los principales órganos. Cualquiera puede asombrarse de este extraordinario –aún sigue siendo frecuente– fenómeno, pero los científicos pretenden descubrir cómo se produce exactamente el desarrollo. Y en lugar de disipar el asombro, el nuevo conocimiento lo incrementa.

Los organismos multicelulares no surgen completamente formados. En su lugar, se originan por un proceso relativamente lento de cambios progresivos que nosotros denominamos **desarrollo**. En casi todos los casos, el desarrollo de un organismo multicelular comienza a partir de una célula –el gameto femenino fecundado, o **cigoto** (célula huevo), que se divide por mitosis para dar origen a todas las células del cuerpo. Tradicionalmente, el estudio del desarrollo animal ha sido denominado **embriología**, comprendiendo la fase de un organismo entre la fecundación y el nacimiento. Pero el desarrollo no se detiene con el nacimiento, o aún en la madurez. La mayoría de los organismos nunca detiene su desarrollo. Cada día reemplazamos más de un gramo de células de la piel (las células viejas comienzan a descamarse cuando nos movemos), y nuestra médula ósea mantiene el desarrollo de millones de glóbulos rojos sanguíneos nuevos durante cada minuto de nuestras vidas. Además, algunos animales pueden regenerar partes cortadas y muchas especies experimentan la metamorfosis (tal como la transformación del renacuajo en una rana o de la oruga en una mariposa). Por esta razón, desde los últimos años se acostumbra a hablar de la **biología del desarrollo** como la disciplina que estudia el desarrollo embrionario y otros procesos de desarrollo.

El desarrollo lleva a cabo dos objetivos fundamentales: genera diversidad celular y orden dentro de cada generación, asegurándose de este modo la continuidad de la vida desde una generación a la siguiente. Por este motivo, hay dos preguntas fundamentales en la biología del desarrollo: ¿cómo hace el gameto femenino fecundado para dar origen al cuerpo del adulto? y ¿cómo los productos del cuerpo del adulto generan además otro cuerpo? Estos dos grandes interrogantes han sido subdivididos en seis preguntas generales examinadas por los biólogos del desarrollo:

- **El interrogante sobre la diferenciación.** Una única célula, el gameto femenino fecundado, da origen a cientos de tipos celulares diferentes –células musculares, células epidérmicas, neuronas, células del cristalino, linfocitos, células sanguíneas, células adiposas y muchas más (fig. 1-1). Esta generación de diversidad celular se denomina diferenciación. Debido a que cada célula del cuerpo (con muy pocas excepciones) contiene el mismo grupo de genes, ¿cómo puede este mismo grupo de instrucciones genéticas producir diferentes tipos celulares? ¿Cómo puede el gameto femenino fecundado generar tantos tipos celulares diferentes?
- **El interrogante sobre la morfogénesis.** Nuestras células diferenciadas no se encuentran distribuidas al azar. De hecho, están organizadas en complicados tejidos y órganos. Durante el desarrollo, las células se dividen, migran y mueren; los tejidos se pliegan y se separan. Los órganos así formados se encuentran organizados de un modo particular: nuestros dedos están siempre en la extremidad de nuestras manos, nunca en el medio; nuestros ojos están siempre en nuestra cabeza, nunca en nuestros dedos del pie o en el intestino. A la creación de esta forma ordenada se la denomina **morfogénesis**. ¿Cómo pueden las células formar tales estructuras ordenadas?
- **El interrogante sobre el crecimiento.** Si cada célula de nuestra cara pudiera continuar tan solo una sola división celular más, podríamos ser considerados como horriblemente malformados. Si cada una de las células de nuestros brazos siguiese tan solo una ronda más de división celular, podríamos atar los cordones de nuestros zapatos sin inclinarnos sobre ellos. ¿Cómo saben nuestras células cuándo es el momento en el que deben detener su división?

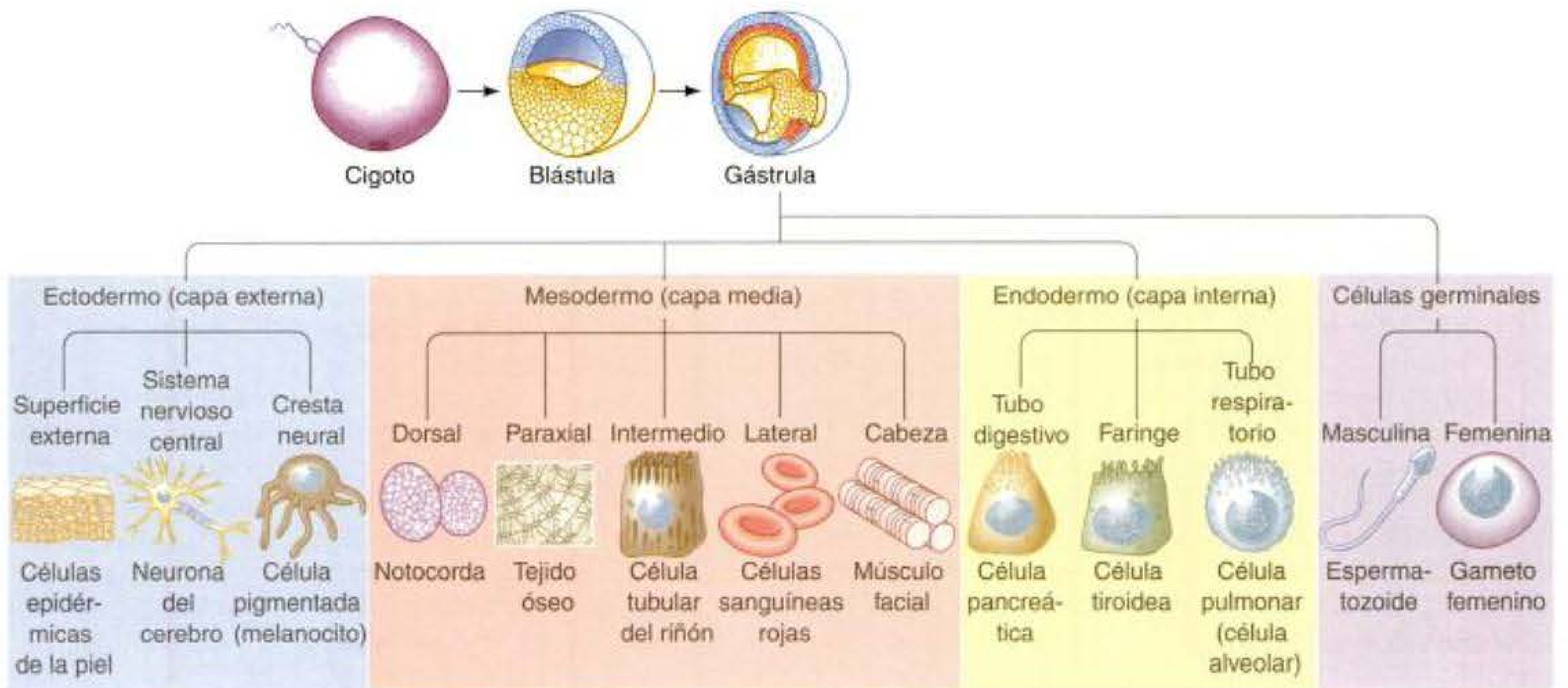


Fig. 1-1. Algunos tipos celulares diferenciados representativos del cuerpo de los vertebrados. La progenie del gameto femenino fecundado debe diversificarse en cientos de tipos celulares. Los tipos celulares están organizados en relación a la capa germinal que les da origen. Se muestra que las células germinales (precursoras de los espermatozoides y gametos femeninos) no se originan a partir de las capas germinales.

Nuestros brazos tienen generalmente el mismo tamaño a ambos lados del cuerpo ¿de qué modo la división celular es regulada de manera tan rigurosa?

- **El interrogante acerca de la reproducción.** El espermatozoide y el gameto femenino son células muy especializadas. Solo ellas pueden transmitir las instrucciones para llevar a cabo la construcción de un organismo desde una generación a la siguiente. ¿Cómo se produce la separación de un grupo de células para formar la siguiente generación? y ¿cuáles son las instrucciones en el núcleo y en el citoplasma que le permiten a ellas funcionar en ese sentido?
- **El interrogante sobre la evolución.** La evolución implica cambios heredados del desarrollo. Cuando decimos que el único dedo del caballo de la actualidad tuvo un antepasado de cinco dedos, estamos diciendo que los cambios en el desarrollo del cartílago y de los músculos se produjeron sobre un gran número de generaciones en los embriones de los antepasados del caballo. ¿Cómo hacen los cambios en el desarrollo para generar nuevas formas corporales? Dada la limitación impuesta por la necesidad de un organismo de sobrevivir mientras éste se desarrolla, ¿qué cambios hereditarios son posibles?
- **El interrogante sobre la integración ambiental.** El desarrollo de muchos (y quizá todos) los organismos es influenciado por señales que provienen del ambiente que rodea al embrión o a las larvas. Algunas mariposas, por ejemplo, heredan la habilidad para producir alas de distintos colores basada en la temperatura o en la cantidad de luz diaria experimentada por la oruga antes de pasar por su metamorfosis. Sin embargo, algunos químicos en el ambiente pueden interrumpir el desarrollo normal, provocando malformaciones en el adulto. ¿Cómo se integra el desarrollo de un organismo en el amplio contexto de su hábitat? y ¿cuáles son las propiedades que permiten a ciertos químicos alterar el desarrollo?

Aproximaciones a la biología del desarrollo

Un campo de la ciencia es definido por las preguntas que éste intenta responder, y la mayoría de las preguntas en biología del desarrollo le ha sido legada a través de su herencia embriológica. Hay numerosas corrientes embriológicas, cada una de las cuales ha predominado durante una era diferente. A veces estas tradiciones son distintas y en ocasiones se mezclan. Se pueden identificar tres aproximaciones principales para estudiar la embriología:

- Aproximación anatómica
- Aproximación experimental
- Aproximación genética

Mientras es verdadero que los abordajes anatómicos dieron origen a las aproximaciones experimentales, y que los enfoques genéticos agregaron los fundamentos de estas dos aproximaciones más tempranas, las tres tradiciones persisten hasta el día de hoy y continúan teniendo un papel de gran importancia en la biología del desarrollo. El capítulo 3 de este texto discute abordajes experimentales, y los capítulos 4 y 5 examinan en gran profundidad los enfoques de la genética. En años recientes, cada una de estas tradiciones se ha asociado con la genética molecular para producir una ciencia de la biología del desarrollo enérgica y multifacética. Sin embargo la base de toda la investigación en la biología del desarrollo es la anatomía cambiante del organismo.

El enfoque anatómico

¿Cuáles son las partes del embrión que forman el corazón? ¿Cómo hacen las células que forman la retina para situarse ellas mismas a una distancia apropiada de aquellas células que forman el cristalino? ¿Cómo se relacionan los tejidos que forman el ala del ave con los tejidos que forman la aleta del pez o la mano del ser humano? ¿Cuáles son los órganos que están afectados por mutaciones en genes específicos? ¿Hay ecuaciones matemáticas que relacionen el crecimiento de diferentes órganos dentro del cuerpo? Éstas son las preguntas realizadas por los anatomistas del desarrollo.

Varias corrientes interrelacionadas forman el enfoque anatómico del desarrollo. La primera corriente es la **embriología comparada**, el estudio sobre cómo cambia la anatomía durante el desarrollo de los diferentes organismos. La segunda, basada en la primera, es la **embriología evolutiva**, el estudio de cómo los cambios en el desarrollo pueden provocar cambios evolutivos y de cómo el linaje de un organismo puede limitar los tipos de cambios que son posibles. La tercera línea del abordaje anatómico a la biología del desarrollo es la **teratología**, el estudio de las anomalías del desarrollo. Un cuarto método usado en la aproximación anatómica es el **modelado matemático**, que intenta describir los fenómenos del desarrollo en término de ecuaciones.

Embriología comparada

El primer estudio conocido sobre anatomía del desarrollo comparada fue realizado por Aristóteles en el siglo IV a.C. En *La generación de animales* (alrededor de 350 a.C.), él observó las diferentes posibilidades de nacimiento de los animales: a partir de huevos (**oviparidad**, como en aves, ranas, y la mayoría de los invertebrados), mediante el nacimiento vivo (**viviparidad**, como en mamíferos placentados) o a través de la producción de un huevo que se abre dentro del cuerpo (**ovoviviparidad**, como ocurre en ciertos reptiles y tiburones). Aristóteles también identificó los dos patrones principales de división celular por los que se forman embriones: patrón de segmentación **holoblástico** (en el que la célula huevo entera es dividida en dos células más pequeñas, como sucede en ranas y en mamíferos) y el patrón de segmentación **meroblástico** (como en los pollos, en donde solo una parte de la célula huevo es destinada a ser embrión, mientras que la otra porción –el vitelo– sirve como nutrición). Y si alguien quisiera conocer quién fue el primero en entender algo sobre las funciones de la placenta y del cordón umbilical, éste fue Aristóteles.

Después de Aristóteles, no se produjo un progreso significativo en la embriología por los dos mil años siguientes. Recién en 1651 William Harvey concluyó que todos los animales –aun los mamíferos– se originan a partir de los huevos (la célula huevo). *Ex ovo omnia* ("Todos a partir del huevo") fue el lema en la portada de su obra *Sobre la generación de las criaturas vivas*, y esto excluyó la generación espontánea de animales a partir del barro o de excrementos. Esta afirmación no fue hecha ligeramente, ya que Harvey sabía que esto iba en contra de las opiniones de Aristóteles, a quien Harvey aún veneraba. (Aristóteles pensaba que el fluido menstrual formaba el material del embrión, mientras que el semen actuaba de modo tal que le daba a éste la forma y la animación.) Harvey también fue el primero en ver el **blastodermo** del embrión de pollo (la pequeña región del huevo que contiene el citoplasma libre de vitelo que dará origen al embrión) y fue el primero en indicar que antes que el corazón aparezca se forman "islotes" de células sanguíneas. Harvey también sugirió que el líquido amniótico podría funcionar como "amortiguador de golpes" para el embrión.

Como podría esperarse, la embriología seguía siendo reducida a especulación hasta que la invención del microscopio permitió observaciones detalladas. En 1672, Marcello Malpighi publicó el primer relato sobre el desarrollo del pollo basándose en el microscopio. Aquí, fueron identificados por vez primera, el surco neural (precursor del tubo neural), los somitas formadores de músculos y la primera circulación de venas y arterias hacia y desde el saco vitelino (fig. 1-2).

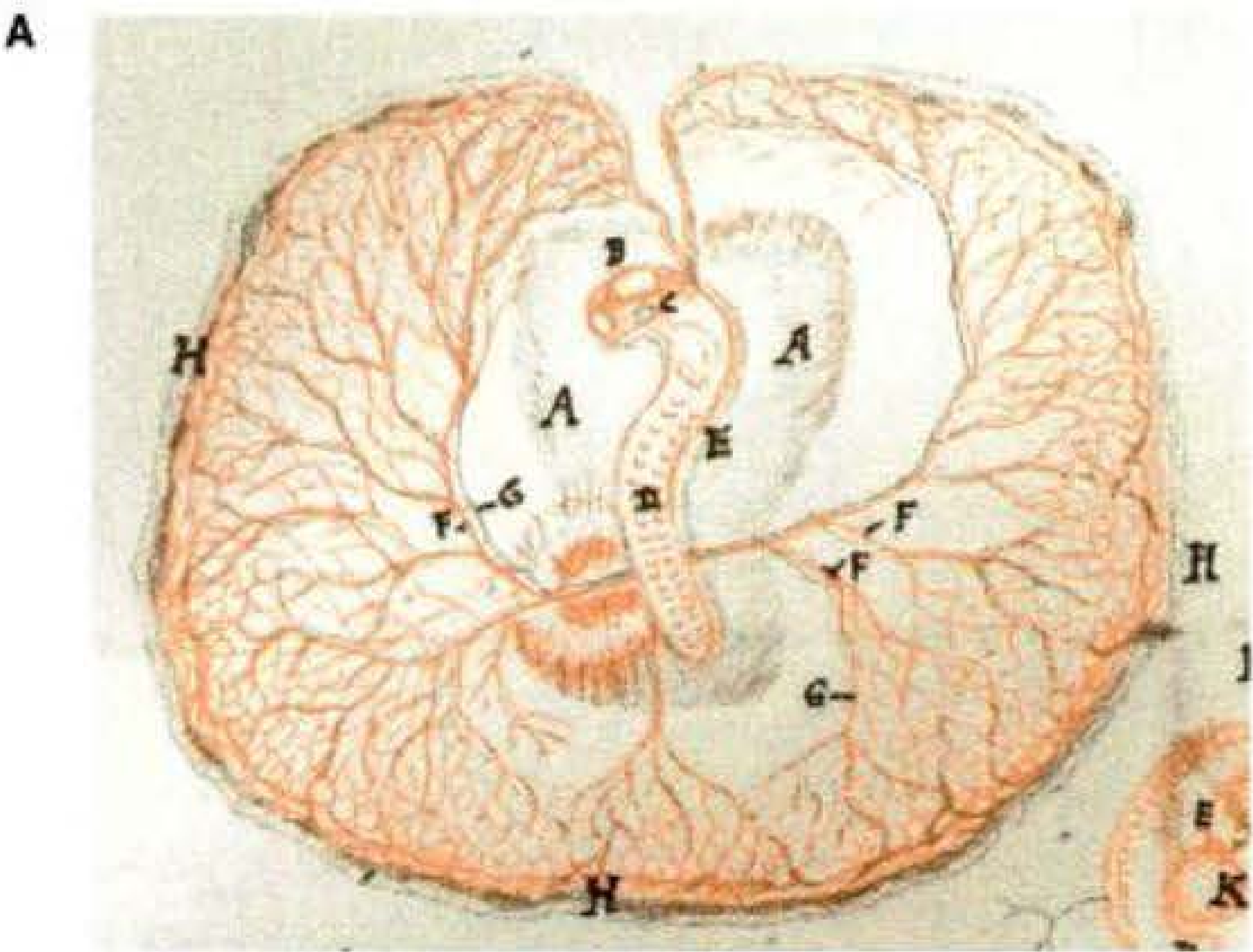
Epigénesis y preformación

Con Malpighi comienza uno de los grandes debates en la embriología: la polémica sobre si los órganos del embrión son formados *de novo* ("empezando de cero") en cada generación, o si los órganos están en realidad presentes, en forma de miniaturas, dentro del gameto femenino (o del espermatozoide). El primer punto de vista es denominado **epigénesis**, y fue respaldado por Aristóteles y Harvey. El segundo criterio, denominado **preformismo**, fue revigorizado con el apoyo de Malpighi. Malpighi demostró que los huevos de pollo sin incubar* tenían en realidad mucha estructura. Esta observación le proporcionó las razones para poner en duda la epigénesis. De acuerdo con la opinión preformacionista, todos los órganos del adulto estaban preestablecidos en miniatura dentro del espermatozoide o (más frecuentemente) en el gameto femenino. No observó que los organismos estuvieran para ser "desarrollados", sino que en todo caso estaban para ser "desenrollados".

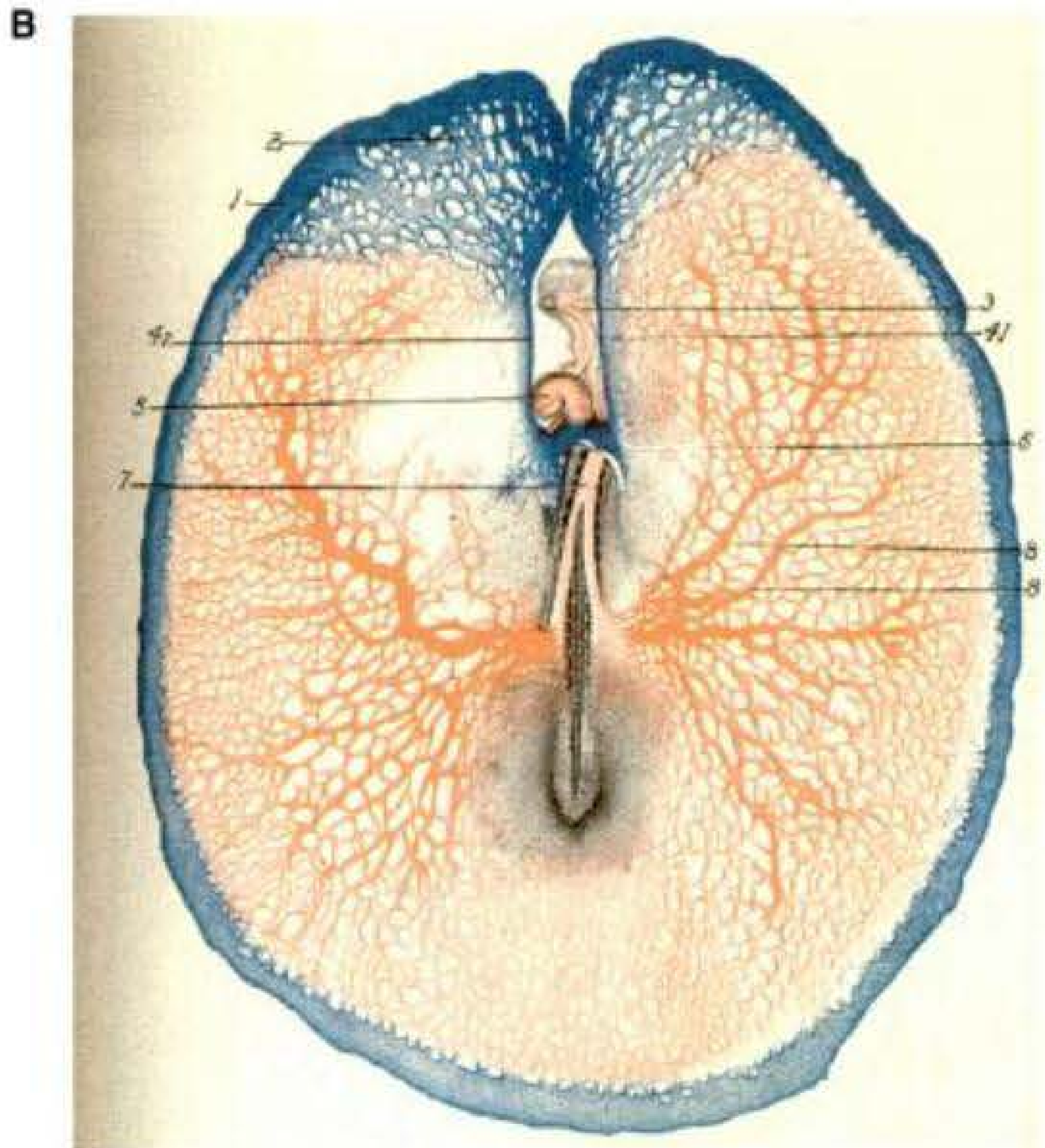
La hipótesis preformacionista tenía el apoyo de la ciencia, de la religión y de la filosofía del siglo XVIII (Gould 1977; Roe 1981; Pinto-Correia 1997). En primer lugar, debido a que todos los órganos estaban preestablecidos, el desarrollo embrionario requería simplemente el crecimiento de las estructuras preexistentes, sin necesitar la formación de otras nuevas. Ninguna fuerza misteriosa extra era necesaria para el desarrollo embrionario. En segundo lugar, tal como el organismo adulto fue preestablecido en las células germinales, otra generación ya existió en un estado preestablecido dentro de las células germinales de la primera generación preestablecida. Esta consecuencia lógica, denominada *emboîtement* (encapsulación), garantizaba que la especie pudiera mantenerse siempre constante. Aunque algunos microscopistas afirmaron

*Como fue precisado por Maître-Jan en 1722, el huevo examinado por Malpighi puede ser técnicamente denominado "sin incubar", pero como fue dejado sobre el sol de Bologna en agosto, no estaba sin calentar.

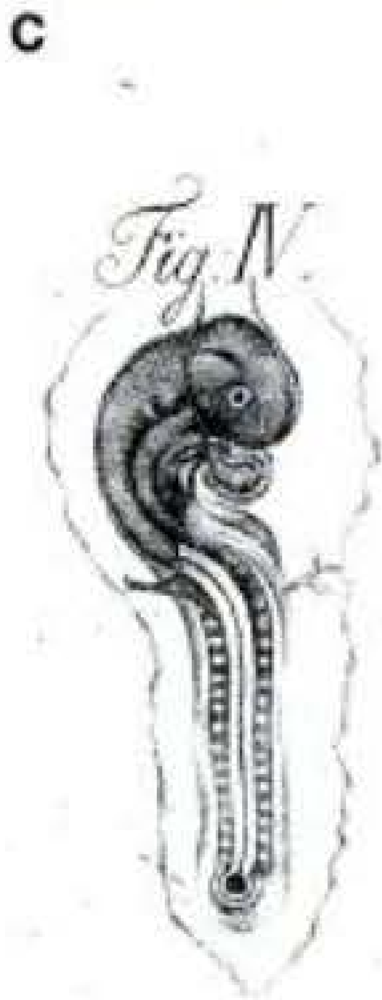
A



B



C



D

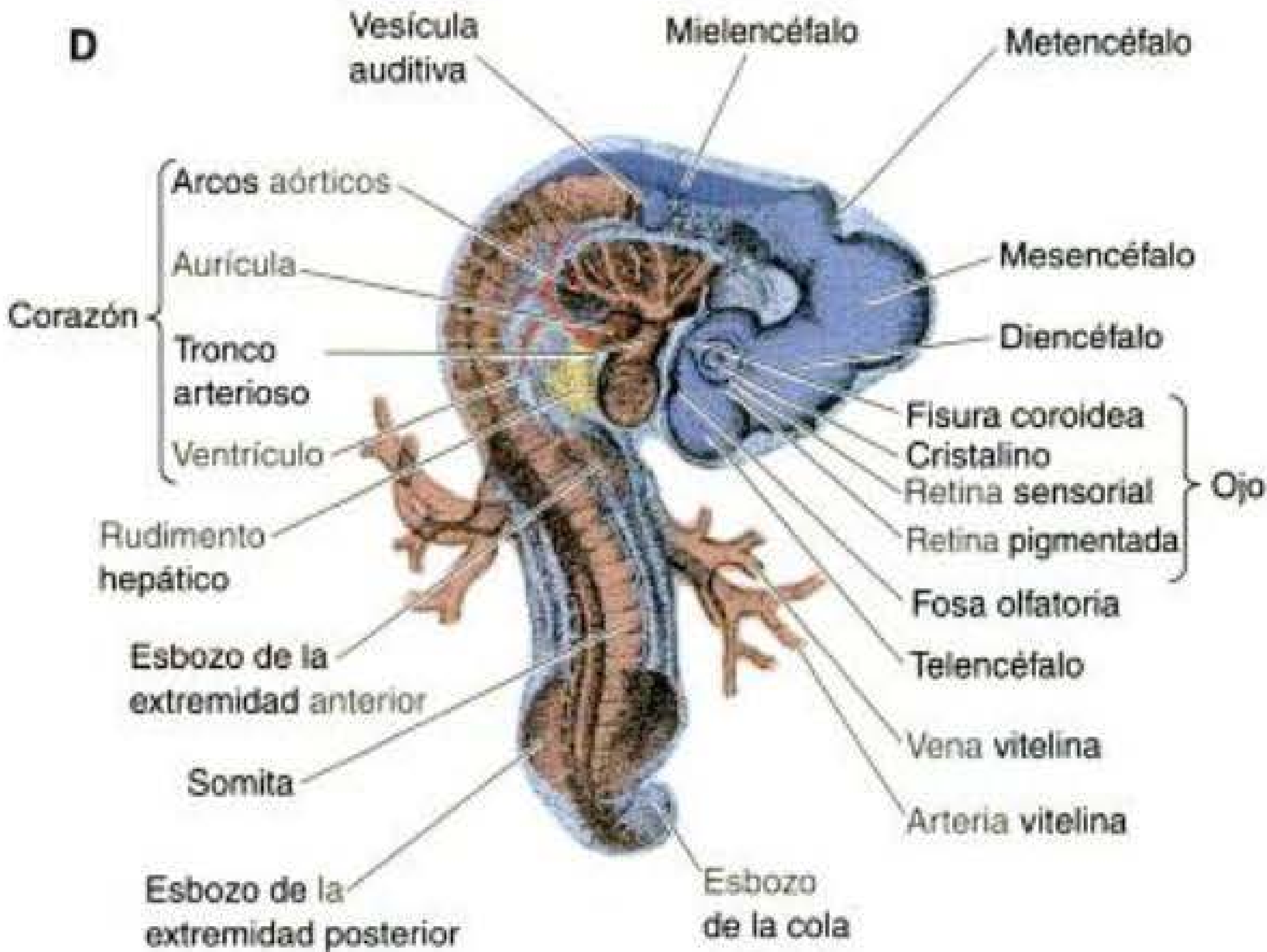


Fig. 1-2. Representaciones de la anatomía del desarrollo del pollo. **A.** Vista dorsal (mirando "hacia abajo" lo que se convertirá en el dorso) de un embrión de pollo de 2 días, tal como fue representado por Marcelo Malpighi en 1672. **B.** Vista ventral (mirando "hacia arriba" el futuro abdomen) de un embrión de pollo de un estado similar, visto e interpretado a través de un microscopio de disección por F. R. Lillie en 1908. **C.** Representación de Eduard d'Alton, en Pander (1817), de un embrión de pollo de un estado de 2 días tardío. **D.** Interpretación moderna de un embrión de pollo de 3 días. Los detalles de la anatomía serán discutidos en los capítulos posteriores. (A de Malpighi 1672; B de Lillie 1908; C de Pander 1817; cortesía de la Biblioteca Ernst Mayr del Museum of Comparative Zoology, Harvard; D, según Carlson 1981.)

ver miniaturas humanas completamente formadas dentro del espermatozoide o del gameto femenino, los principales impulsores de esta hipótesis –Albrecht von Haller y Charles Bonnet– sabían que los sistemas de órganos se desarrollan a diferentes velocidades, y que las estructuras no necesitan localizarse en el embrión en el mismo lugar que ocupan en el recién nacido.

Los preformacionistas no tenían una teoría celular que proporcionara el límite más bajo de tamaño de sus organismos preformados (la teoría celular se originó a mediados de 1800), ni tenían la opinión de que la permanencia de la especie humana sobre la Tierra fuera potencialmente infinita. En su lugar, decía Bonnet (1764): "La naturaleza trabaja tan pequeño como lo desea", y la especie humana existió en un tiempo limitado entre la Creación y la Resurrección. Este punto de vista estuvo en concordancia con la ciencia más relevante de esa época, de acuerdo con el principio del filósofo-matemático Francés René Descartes sobre el principio de la divisibilidad infinita de una naturaleza mecánica iniciada, pero no interferida, por Dios. Esto también se ajustó al punto de vista de la iluminación divina. El sacerdote-científico Nicolás Malebranche vio en la preformación la fusión de Dios que da las reglas del Cristianismo con la ciencia cartesiana (Churchill 1991; Pinto-Correia 1997).*

* La preformación era una teoría conservadora que acentuaba la ausencia de cambios entre las generaciones. Su principal falla fue su imposibilidad para explicar las variaciones conocidas por la evidencia genética limitada de su tiempo. Se sabía, por ejemplo, que el apareamiento entre los padres blancos y negros producía niños de piel de color intermedio, algo imposible si la herencia y el desarrollo se producían únicamente a través del espermatozoide o del gameto femenino. En experimentos más controlados, el botánico alemán Joseph Kölreuter (1766) generó plantas híbridas del tabaco que tenían las características de ambas especies. Por otra parte, mediante el apareamiento del híbrido con el padre masculino o femenino, Kölreuter podía "revertir" el híbrido de nuevo a uno u otro tipo parental luego de varias generaciones. Así, la herencia parecía originarse a partir de una mezcla de componentes de los padres.

El argumento embriológico de la epigénesis fue reactivado al mismo tiempo por Kaspar Friedrich Wolff, un embriólogo alemán que trabajaba en San Petersburgo. Mediante observaciones cuidadosas del desarrollo del embrión de pollo, Wolff demostró que las regiones embrionarias se desarrollan a partir de tejidos que no tienen un equivalente en el organismo adulto. El corazón y los vasos sanguíneos (que, de acuerdo con los preformacionistas, tenían que estar presentes desde el comienzo para asegurar el crecimiento embrionario) podían ser vistos desarrollándose nuevamente en cada embrión. Del mismo modo, se observó que el tubo intestinal se originaba mediante el plegamiento de un tejido originalmente plano. Esta última observación fue explícitamente detallada por Wolff, que proclamó (1767): "Cuando se ha considerado debidamente la formación del intestino mediante este modo, casi no puede quedar duda, yo creo, en la verdad de la epigénesis." Sin embargo, para explicar cómo un organismo es creado nuevamente en cada generación, Wolff tuvo que postular una fuerza desconocida, la *vis essentialis* ("fuerza esencial"), que, actuando de acuerdo con leyes naturales tal como lo hacen la gravedad y el magnetismo, podría organizar el desarrollo embrionario.

Una reconciliación de clases fue intentada por el filósofo alemán Immanuel Kant (1724-1804) y su colega, el biólogo Johann Friedrich Blumenbach (1752-1840). Intentando construir una teoría científica sobre la descendencia racial, Blumenbach postuló una fuerza mecánica, objetivo-dirigida denominada de *Bildungstrieb* ("fuerza del desarrollo"). Semejante fuerza, él decía, no era teórica, sino que podía demostrarse su existencia mediante experimentación. Una *hidra*, cuando es cortada, regenera sus regiones amputadas mediante la reorganización de los elementos existentes (véase cap. 18). Algunos de los propósitos de la fuerza organizadora pueden ser observados en funcionamiento, y esta fuerza era una propiedad del mismo organismo. Esta *Bildungstrieb* debía sin embargo ser heredada a través de las células germinales. Por esta razón, el desarrollo podía continuar a través de una fuerza predeterminada intrínseca que se hallaba en la materia del embrión (Cassirer 1950; Lenoir 1980). Por otra parte, se creía que esta fuerza era susceptible a cambios, como lo demostró la variante de caracol enroscado hacia la izquierda (donde los caracoles enroscados hacia la izquierda pueden producir progenies enroscadas hacia la derecha). En esta hipótesis, en donde el desarrollo epigenético es dirigido por instrucciones preformadas, no estamos lejos de la opinión de los biólogos modernos que sostienen que la mayoría de las instrucciones para formar un organismo está ya presente en la célula huevo.

Poniendo nombre a las partes: las capas germinales primarias y los órganos tempranos

El final del preformacionismo no se produjo hasta el año 1820, cuando una combinación de nuevas técnicas de tinción, de microscopios mejorados y de reformas institucionales en las universidades alemanas creó una revolución en la embriología descriptiva. Las nuevas técnicas permitieron a los microscopistas documentar la epigénesis de las estructuras anatómicas y las reformas institucionales proporcionaron público para estos informes y estudiantes para continuar el trabajo de sus profesores. Entre los más talentosos de este nuevo grupo orientado hacia el uso del microscopio se encontraban tres amigos, nacido uno un año después del otro, todos ellos eran provenientes de la región Báltica y estudiaron en el norte de Alemania. Los trabajos de Christian Pander, Karl Ernst von Baer y Heinrich Rathke transformaron la embriología en una rama especializada de la ciencia.

Pander estudió el embrión de pollo por menos de dos años (antes de llegar a ser un paleontólogo), pero en aquellos 15 meses, descubrió las capas germinales,* tres regiones distintas del embrión que darán origen a sistemas de órganos específicos (véase fig. 1-1).

- El **ectodermo** genera la capa externa del embrión. Produce la capa superficial (epidermis) de la piel y también da origen al sistema nervioso.
- El **endodermo** que llega a ser la capa más interna del embrión y produce el epitelio del tubo digestivo y de sus órganos asociados (incluidos los pulmones).
- El **mesodermo** se sitúa intercalado entre el ectodermo y el endodermo. Genera la sangre, el corazón, los riñones, las gónadas, los huesos, los músculos y los tejidos conectivos.

Estas tres capas se encuentran en los embriones de todos los organismos **triploblásticos** (tres-capas). Algunos filos, como las poríferas (esponjas), los cnidarios (véase anémonas, *hidra*, medusa) y los ctenóforos (portadores de peines o nueces de mar) carecen de un verdadero mesodermo y se consideran animales **diploblásticos**.

Pander llevó a cabo además observaciones que inclinaron la balanza a favor de la epigénesis. Las capas germinales no formaban sus órganos independientemente (Pander 1817). En realidad, cada capa germinal "no es aún lo suficientemente independiente como para indicar lo que en verdad es, éstas necesitan todavía la ayuda de sus hermanas de viaje, y por lo tanto, aunque en realidad están designadas para diferentes fines, las tres se influencian colectivamente una con otra hasta que cada una de ellas ha alcanzado un nivel apropiado". Pander había descubierto las interacciones de los tejidos que ahora denominamos **inducción**. Ningún tejido tiene el poder para construir órganos por sí mismo; éste debe interactuar con otros tejidos. (En el capítulo 6 se discutirán minuciosamente los principios de la inducción.) De este modo, Pander sentía que la preformación no podía ser verdadera, debido a que los órganos se originan a través de interacciones entre estructuras más simples.

La fama del libro de Pander se debe curiosamente a sus grabados; el artista, Eduard d'Alton, dibujó detalles para los cuales el vocabulario todavía no había sido inventado. En la actualidad podemos mirar esos dibujos y observar cinco regiones del cerebro embrionario del pollo, aunque estas regiones no habían sido aún definidas separadamente o no se habían dado sus nombres (véase fig. 1-2C; Churchill 1991). La capacidad para realizar observaciones precisas ha estado siempre entre las grandes habilidades de los embriólogos y en la actualidad los

*De la misma raíz que la germinación: del latín *germen*; significa "brote" o "esbozo". Los nombres de las tres capas germinales son del griego: ectodermos de *ektos* ("afuera") más *derma* (piel); mesodermo de *mesos* ("medio") y endodermo de *endon* ("dentro").



Fig. 1-3. Arcos faríngeos (también llamados arcos branquiales y arcos de las agallas) en el embrión de la salamandra *Ambystoma mexicanum*. El ectodermo superficial ha sido retirado para permitir la visualización fácil de estos arcos (resaltados) mientras se forman. (Fotografía cortesía de P. Falck y L. Olsson.)

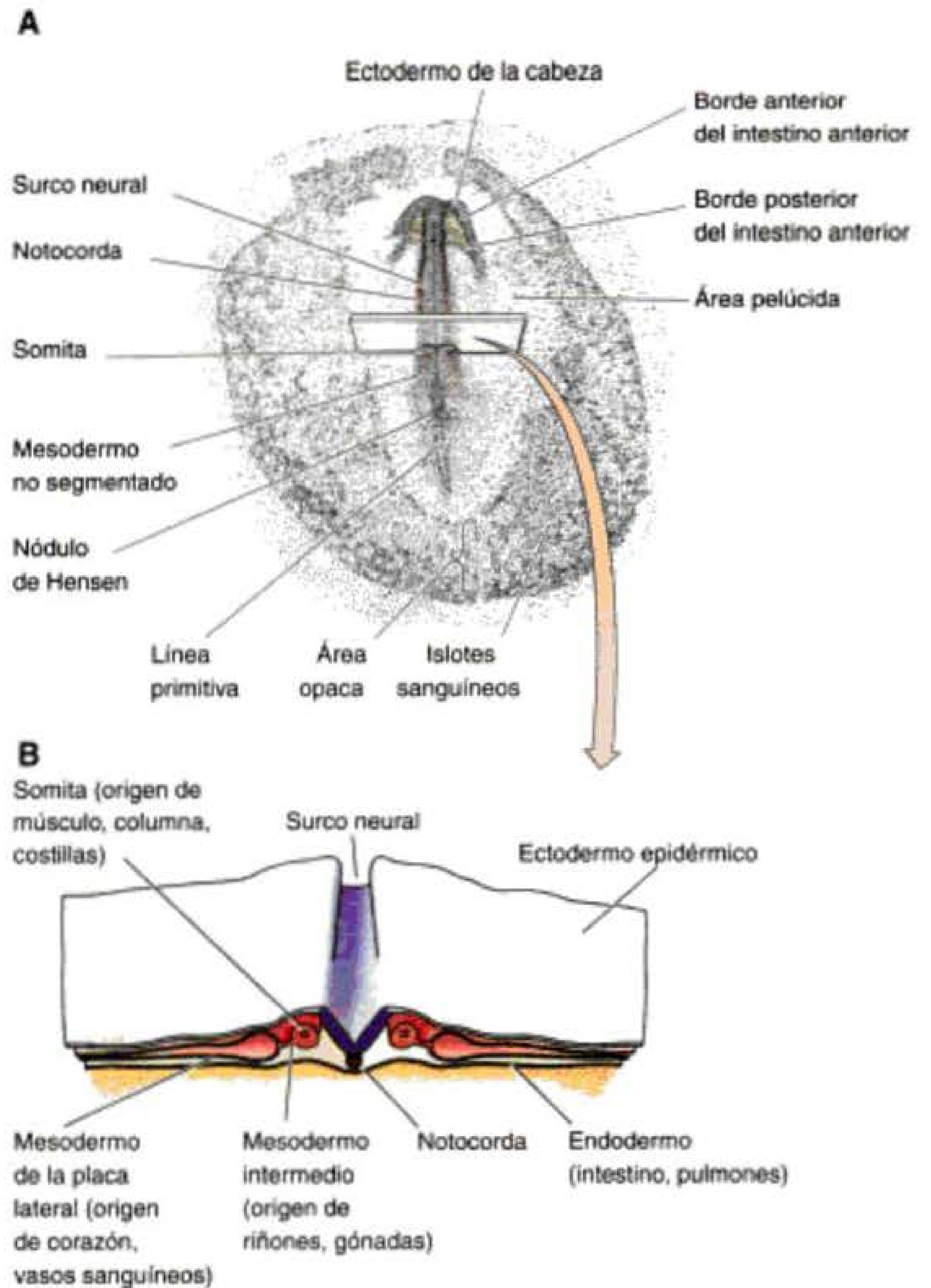


Fig. 1-4. Notocorda en el embrión de pollo. **A.** Vista dorsal de un embrión de pollo de 24 horas. **B.** Una sección transversal a través del tronco muestra la notocorda y el tubo neural en desarrollo. Comparando las figuras 1-2 y 1-4 pueden observarse cambios significativos entre los días 1, 2 y 3 del huevo de pollo en incubación. (A, según Patten 1951.)

biólogos del desarrollo modernos estudiando los patrones de expresión de genes están "descubriendo" regiones del embrión que fueron observadas por los embriólogos un siglo atrás.

Heinrich Rathke observaba el desarrollo de ranas, salamandras, peces, aves y mamíferos, y acentúo las semejanzas en el desarrollo de todos estos grupos vertebrados. Durante sus 40 años de investigación embriológica, describió en su primera época los **arcos faríngeos** de los vertebrados (fig. 1-3), que se convierten en el aparato branquial de los peces pero que en los mamíferos dan origen a la mandíbula y a los oídos (entre otras cosas, como se verá en la figura 1-14). Rathke describió la formación del cráneo de los vertebrados, y el origen de los sistemas reproductor, excretor y respiratorio; también estudió el desarrollo de los invertebrados, especialmente el cangrejo. En la actualidad él es conmemorado en el nombre de la "bolsa de Rathke", el rudimento embrionario de la porción glandular de la hipófisis. Que él pudiera ver tal estructura usando las técnicas disponibles de aquella época es testimonio de su extraordinario poder de observación y de su mano constante.

Los cuatro principios de Karl Ernst von Baer

Karl Ernst von Baer amplió los estudios de Pander del embrión de pollo. Descubrió la **notocorda**, el cordón de mesodermo más dorsal que separa el embrión en una mitad derecha y otra izquierda y que instruye al ectodermo que se encuentra sobre ella para convertirse en el sistema nervioso (fig. 1-4). También descubrió el gameto femenino de mamíferos (observó el ovocito dentro del ovario), aquella célula buscada durante largo tiempo que cada uno creía que existía pero que nadie había visto aún.*

En 1828, von Baer relató: "Tengo dos embriones pequeños conservados en alcohol, que olvidé de etiquetar. En este momento soy incapaz de determinar el género al que pertenecen. Ellos podrían ser lagartos, aves pequeñas o aún mamíferos." La figura 1-5 permite apreciar su dilema. Todos los embriones de vertebrados (peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos) comienzan con una estructura básicamente similar. A partir de su detallado estudio del desarrollo del pollo y su comparación del embrión de pollo con los embriones de otros vertebrados, von Baer derivó en cuatro generalizaciones. Actualmente a menudo referidas como "las leyes de von Baer", ellas se exponen aquí con algunos ejemplos de vertebrados.

1. **Las características generales de un grupo más grande de animales aparecen antes en el desarrollo que aquellas características especializadas de un grupo más pequeño.** Todos los vertebrados en desarrollo parecen ser muy similares poco tiempo después de la gastrulación. Solo posteriormente en el desarrollo emergen las características especiales de clase, orden y finalmente especie. Todos los embriones de vertebrados tienen arcos branquiales, notocorda, médula espinal y riñones primitivos.

---

* Von Baer apenas podía creer que él finalmente lo había encontrado cuando muchos otros –Harvey, de Graaf, von Haller, Prevost, Dumas y aun Purkinje– habían fallado. "Retrocedí como si fuera alcanzado por un rayo... Tuve que intentar relajarme por un momento antes de que pudiera tomar suficiente coraje para mirar otra vez, ya que tenía miedo porque un fantasma me había asustado. ¿No es extraño que una visión que es esperada, y que en efecto se esperaba, puede ser aterradora cuando ésta eventualmente se materializa?"



Fig. 1-5. Las similitudes y diferencias entre diversos embriones de vertebrados tal como avanzan a través del desarrollo. Cada uno de ellos comienza con una estructura básicamente similar, aunque adquieren esta estructura a diferentes edades y tamaños. A medida que se desarrollan se parecen menos entre sí. (Adaptado de Richardson y col. 1998; fotografía cortesía de M. Richardson.)

2. **Los caracteres menos generales se desarrollan a partir de los más generales, hasta que finalmente aparecen los más especializados.** Todos los vertebrados tienen inicialmente el mismo tipo de piel. Solo posteriormente la piel desarrolla escamas en los peces, escamas en los reptiles, plumas en las aves, o el pelo, garras y uñas de mamíferos. Del mismo modo, el desarrollo temprano del miembro es esencialmente el mismo en todos los vertebrados. Solo posteriormente se hacen evidentes las diferencias entre patas (piernas), alas y brazos.*

3. **El embrión de una especie dada, en lugar de pasar por los estados adultos de los animales inferiores, se aparta cada vez más de ellos.**† Las hendiduras viscerales de aves y mamíferos embrionarios, en detalles, no tienen semejanzas con las hendiduras branquiales de los peces adultos. En su lugar, ellas se asemejan a las hendiduras viscerales de los *embriones* de peces y de otros *embriones* de vertebrados. Mientras que el pez preserva y transforma estas hendiduras en verdaderas hendiduras branquiales, los mamíferos las convierten en estructuras tales como la trompa de Eustaquio (entre el oído y la nasofaringe).

4. **Por lo tanto, el embrión temprano de un animal superior nunca se parece a un animal inferior, tan solo tendrá semejanzas con su embriones tempranos.** Los embriones humanos nunca pasan a través de estados equivalentes a un pez o ave adulto. Más precisamente, los embriones humanos inicialmente comparten características en común con los embriones de peces y aves. Posteriormente, los mamíferos y otros embriones divergen, sin pasar ninguno de ellos a través de los estados de los otros.

Von Baer también reconoció que hay un patrón común en el desarrollo de todos los vertebrados: las tres capas germinales dan origen a los diferentes órganos, y el origen de estos órganos es constante si el organismo es un pez, una rana o un pollo.

SITIO WEB 1.1 **La recepción de los principios de von Baer (The reception of von Baer´s principles).** La aceptación de los principios de von Baer y su interpretación han variado enormemente en los últimos cien años. La evidencia reciente sugiere que un investigador importante de 1800 incluso fabricó datos cuando su propia teoría fue contra estos postulados.

Mapa de destino del embrión

Hacia fines de la década de 1800, la célula había sido demostrada de manera concluyente para ser la base de la anatomía y de la fisiología. Los embriólogos comenzaron también a basar su campo en la célula. Uno de los programas más importantes de la embriología descriptiva llegó a ser el trazado de **linajes celulares:** siguiendo células individuales para observar lo que ellas llegan a ser. En muchos organismos, no es posible una resolución tan fina, pero se pueden marcar grupos de células para ver en qué área del embrión llegarán a formar parte. Reuniendo todos estos estudios es posible construir un **mapa de destino**. Estos diagramas "trazan un mapa" de la estructura larval o adulta sobre la región del embrión a partir de la cual fueron obtenidos los datos. Los mapas de destino constituyen las bases de la embriología experimental, debido a que proporcionan a los investigadores la información sobre qué partes del embrión normalmente llegan a ser un determinado tipo de estructura larval o adulta. Los mapas de destino de algunos embriones en el estado de gástrula temprana se muestran en la figura 1-6. Los mapas de destino han sido generados de varios modos.

OBSERVACIÓN DE EMBRIONES VIVOS. En algunos invertebrados, los embriones son transparentes, tienen relativamente pocas células y las células hijas se mantienen muy cercanas entre sí. En tales casos, es posible en realidad mirar a través del microscopio y trazar los descendientes de una célula específica en los órganos que ella genera. Este tipo de estudios fue realizado cerca de un siglo atrás por Edwin G. Conklin. En uno de estos estudios, él tomó huevos del tunicado *Styela partita*, una ascidia que reside en las aguas de la costa de Massachusetts, y siguió pacientemente el destino de cada célula del embrión hasta que se diferenciaban en

* *Nota del traductor:* los términos pata (pierna) o brazo responden a una descripción general de lo que podría ser considerado como una expresión similar a la de miembro inferior y superior respectivamente (para el caso del ser humano). En términos anatómicos más precisos el miembro superior se divide en las regiones de la cintura escapular, brazo, antebrazo y mano; el miembro inferior se divide en las regiones de la cintura pelviana, muslo, pierna y pie.

† Von Baer formuló estas generalizaciones antes de la teoría de la evolución de Darwin. "Los animales más inferiores" serían aquellos que aparecieron más temprano en la historia de la vida.

estructuras específicas (fig. 1-7, Conklin 1905). Él fue ayudado en ese esfuerzo por la singularidad del huevo de *Styela*, en el cual las diferentes células contienen distintos pigmentos. Por ejemplo, las células formadoras de músculo siempre tienen un color amarillo. El mapa de destino de Conklin fue confirmado mediante experimentos de extirpación de células. La eliminación de la célula B4.1 (que de acuerdo con el mapa debería producir todos los músculos de la cola), por ejemplo, resultó en la ausencia de los músculos de la cola (Reverberi y Minganti 1946).

SITIO WEB 1.2 **Arte y ciencia de Conklin (Conklin's art and science).** Las láminas de la destacada publicación de Conklin de 1905 se encuentran en línea. Mirándolas se puede ver la precisión de sus observaciones y de cómo construyó su mapa de destino de los embriones de tunicado.

VADE MECUM[2] **El microscopio compuesto (The compound microscope).** El microscopio compuesto ha sido la herramienta crítica de los anatomistas del desarrollo. La maestría de las técnicas de microscopia permite ingresar en el mundo de la forma y del modelado.
[Hacer clic sobre Microscope]

MARCA DE COLORANTE VITAL. La mayoría de los embriones no son demasiado complacientes en tener células de colores diferentes. Tampoco todos los embriones tienen pocas células como los tunicados. En los primeros años del siglo XX, Vogt (1929) rastreó el destino de diferentes áreas del huevo de anfibio al poner colorantes vitales sobre la región de interés. Los colorantes vitales teñirán las células sin matarlas. Mezcló el colorante con agar y esparció el agar sobre un portaobjetos de microscopio para secarlo. Los extremos del agar coloreados serán muy delgados. Cortó finas rodajas a partir de estos extremos y las colocó sobre un embrión de rana. Posteriormente a la tinción de las células por el colorante, las rodajas de agar fueron retiradas y se pudieron seguir los movimientos celulares dentro del embrión (fig. 1-8).

COLORANTES FLUORESCENTES Y MARCA RADIACTIVA. Una variante de la técnica de marcación con colorante es hacer a un área del embrión radiactiva. Para ello, en general se hace crecer a un embrión donante en una solución con timidina radiactiva. Esta base podría será incorporada en el DNA de las células del embrión que se hallan en división. A un segundo embrión (el embrión huésped) se lo hace crecer bajo condiciones normales. La región de interés es eliminada en el embrión huésped y reemplazada por un injerto radiactivo obtenido a partir del embrión donante. Luego de un tiempo, el embrión huésped es cortado para microscopia. Las células que son radiactivas serán las descendientes de las células del injerto, y pueden ser distinguidas mediante **radioautografía**. Los portaobjetos de microscopio fijados que contienen la sección son bañados en una emulsión fotográfica. Los electrones de alta energía de la timidina radiactiva reducirán los iones de plata en la emulsión (tal como la luz). El resultado es un grupo de granos de plata oscuros directamente sobre la región radiactiva. De este modo, ha sido determinado el destino de las diferentes regiones del embrión de pollo (Rosenquist 1966).

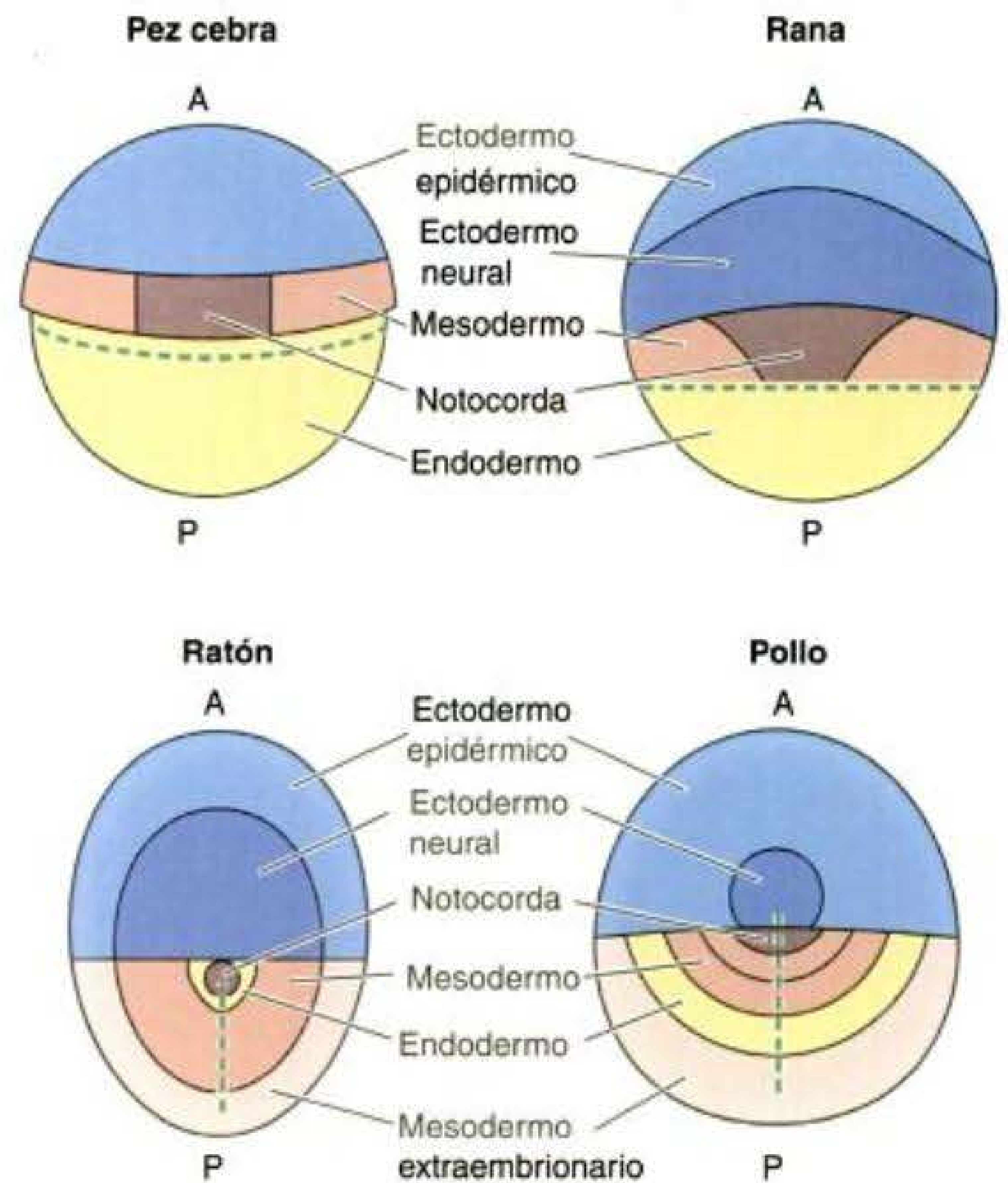
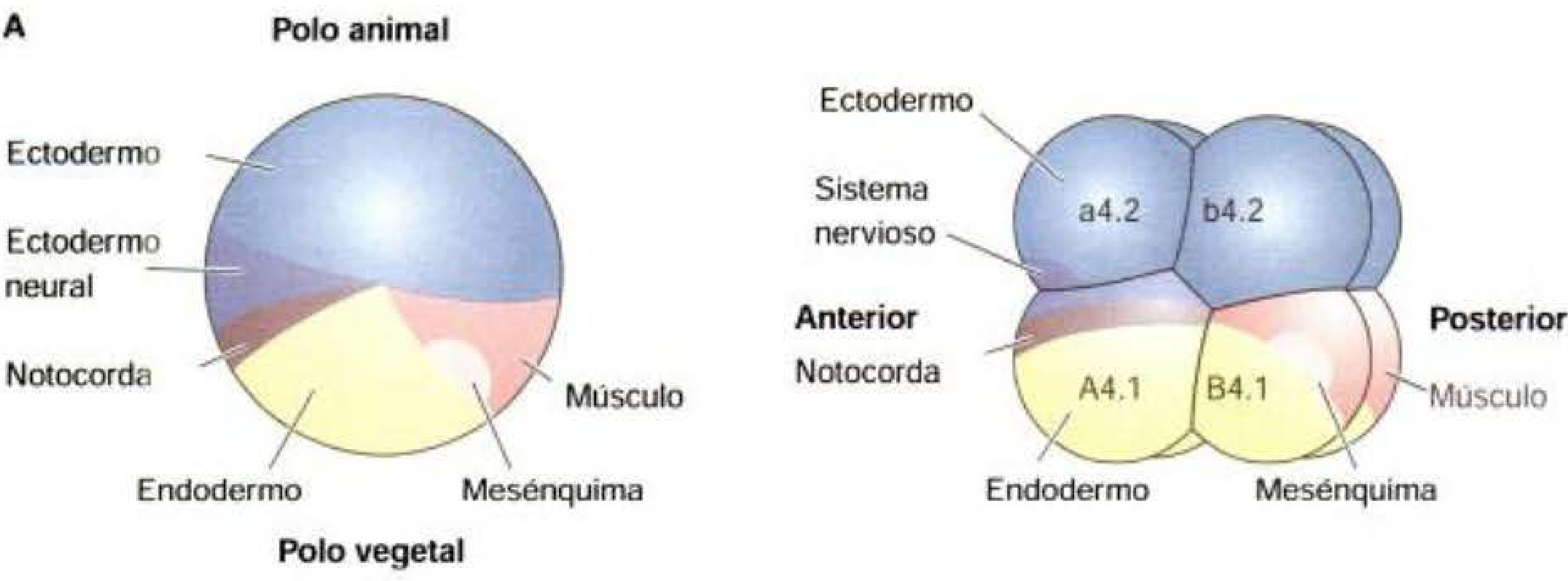


Fig. 1-6. Mapas de destino de diferentes clases de vertebrados en el estado de gástrula temprana. Todas son vistas superficiales dorsales (mirando "hacia abajo" lo que será en el embrión su dorso). A pesar de las diferentes apariencias de estos animales adultos, sus mapas de destinos muestran muchas semejanzas entre los embriones. Las células que formarán la notocorda ocupan una posición dorsal central, mientras que los precursores del sistema neural se encuentran inmediatamente anterior a ésta. El ectodermo neural está rodeado por menos ectodermo dorsal, el cual formará la epidermis de la piel. A indica el extremo anterior del embrión; P, el extremo posterior. La línea de puntos verde indica el sitio de invaginación; el camino que las células seguirán cuando migren desde el exterior al interior del embrión.

Uno de los problemas con los colorantes vitales y los marcadores radiactivos es que como se diluyen en cada división celular, se vuelve dificultosa su detección. Una opción para resolver este problema es el uso de marcadores fluorescentes que son tan intensos que una vez inyectados en las células individuales pueden ser detectados todavía en la progenie de estas células a lo largo de muchas divisiones posteriores. Dextrán conjugado con fluoresceína, por ejemplo, puede ser inyectado en una sola célula de un embrión temprano, y los descendientes de esta célula pueden ser vistos mediante el examen del embrión bajo luz ultravioleta (fig. 1-9). Más recientemente, *dil*, una poderosa molécula fluorescente que se incorpora en los lípidos de la membrana, también ha sido utilizada para seguir el destino de las células y de su progenie.

A



B

Estado de 2 células | Estado de 4 células | Estado de 8 células | Estado de 16 células | Estado de 32 células | Estado de 64 células | Derivados

AB2
A3 — Anterior
A4.1 — Vegetal
A5.1
A6.1
A7.1 Endodermo
A7.2 Endodermo
A6.2
A7.3 Notocorda
A7.4 Tronco cerebral
A5.2
A6.3
A7.5 Endodermo
A7.6 Notocorda
A6.4
A7.7 Notocorda
A7.8 Médula espinal, músculo caudal
a4.2 — Animal
a5.3
a6.5
a7.9 Cerebro
a7.10 Cerebro
a6.6
a7.11 Tentáculos
a7.12 Epidermis
a5.4
a6.7
a7.13 Órgano del sentido
a7.14 Epidermis
a6.8
a7.15 Epidermis
a7.16 Epidermis

Mitad del embrión

B3 — Posterior
B4.1 — Vegetal
B5.1
B6.1
B7.1 Endodermo
B7.2 Endodermo
B6.2
B7.3 Mesénquima
B7.4 Músculo
B5.2
B6.3
B7.5 Músculo
B7.6 Músculo
B6.4
B7.7 Mesénquima
B7.8 Músculo
b4.2 — Animal
b5.3
b6.5
b7.9 Epidermis, músculo caudal
b7.10 Epidermis
b6.6
b7.11 Epidermis
b7.12 Epidermis
b5.4
b6.7
b7.13 Epidermis
b7.14 Epidermis
b6.8
b7-15 Epidermis
b7.16 Epidermis

Fig. 1-7. Mapa de destino de un embrión de tunicado. **A.** El embrión de 1 célula (izquierda), mostrado poco antes de la primera división celular, indicándose el destino de las regiones citoplasmáticas. El embrión de 8 células sobre la derecha muestra estas regiones luego de tres divisiones celulares. **B.** Una versión lineal del mapa de destino, muestra los destinos de cada una de las células del embrión. Durante todo este libro usaremos la convención de colores de la anatomía del desarrollo: azul para el ectodermo, rojo para el mesodermo y amarillo para el endodermo. (**A**, según Nishida 1987 y Reverberi y Minganti 1946; **B**, según Conklin 1905 y Nishida 1987.)

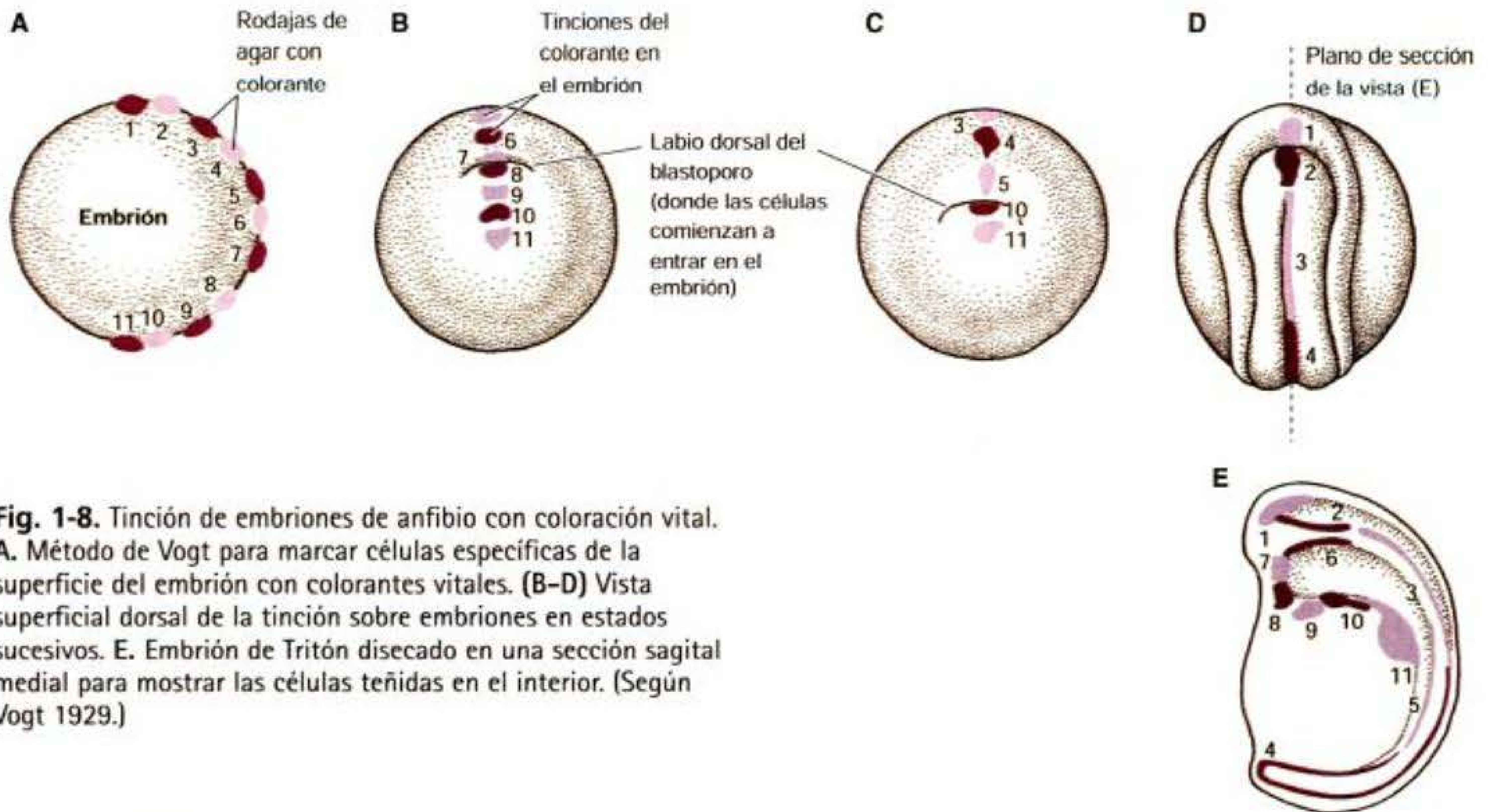


Fig. 1-8. Tinción de embriones de anfibio con coloración vital. **A.** Método de Vogt para marcar células específicas de la superficie del embrión con colorantes vitales. **(B-D)** Vista superficial dorsal de la tinción sobre embriones en estados sucesivos. **E.** Embrión de Tritón disecado en una sección sagital medial para mostrar las células teñidas en el interior. (Según Vogt 1929.)

MARCA GENÉTICA. Un método permanente de marcación de células y de seguimiento de sus destinos es la creación de embriones mosaico que tendrán diferentes constituciones genéticas. Uno de los mejores ejemplos de esta técnica es la construcción de **embriones quiméricos** que consiste, por ejemplo, en un injerto de células de codorniz dentro de un embrión de pollo. El pollo y la codorniz se desarrollan de un modo muy similar (especialmente durante el desarrollo embrionario temprano), y un injerto de células de la codorniz se integrará en un embrión de pollo y participará en la construcción de varios órganos. El reemplazo de las células del pollo por las células de la codorniz puede realizarse en un embrión mientras éste se encuentre todavía en el interior del huevo, y el pollo que nacerá tendrá células de la codorniz en sitios específicos, dependiendo de dónde fue colocado el injerto. Las células de la codorniz difieren de las del pollo en dos aspectos importantes. En primer lugar, la

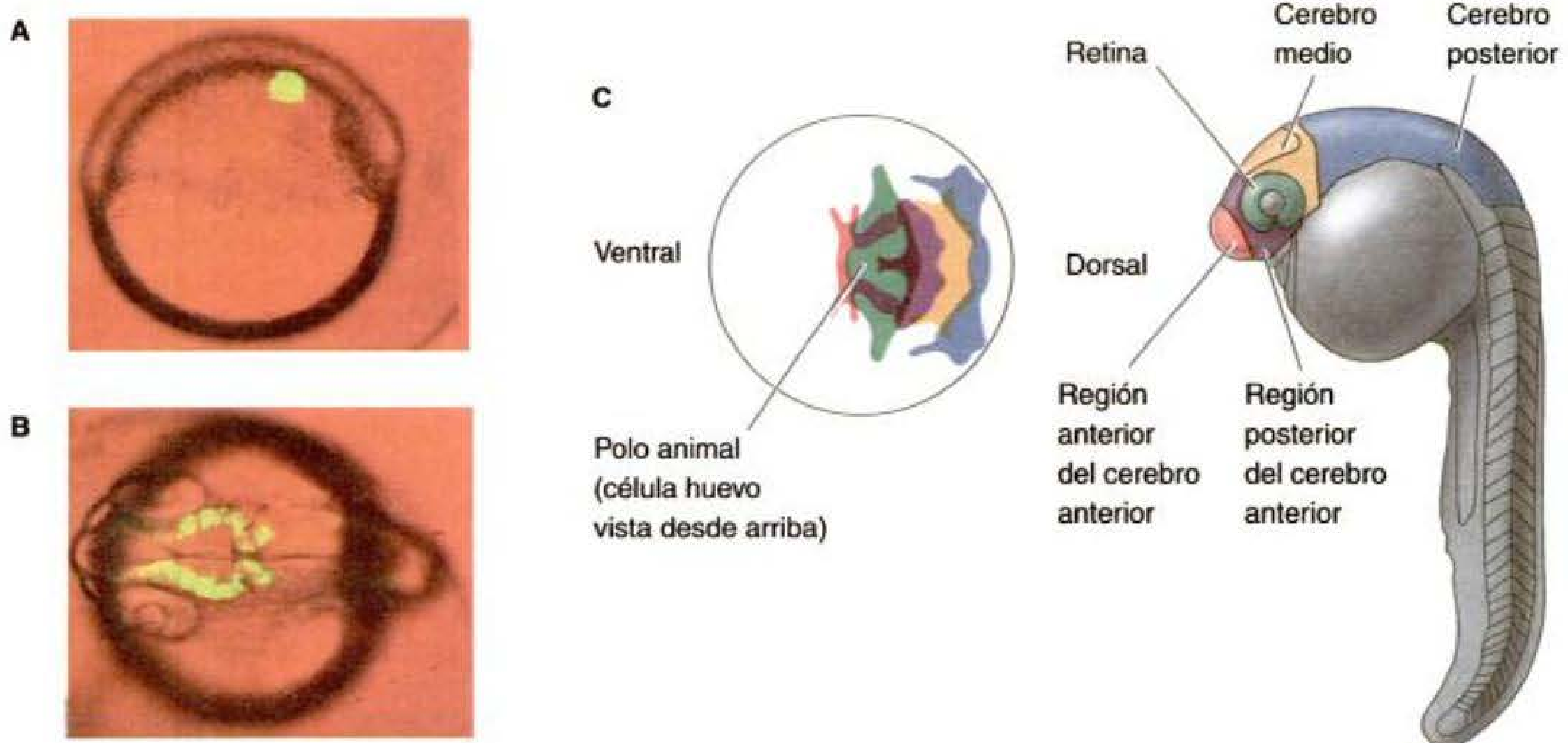


Fig. 1-9. Mapa de destino utilizando una tinción fluorescente. **A.** Células específicas de un embrión de pez cebra fueron inyectadas con un marcador fluorescente que no podrá difundirse desde las células. El marcador fue activado luego mediante láser en una pequeña región (alrededor de 5 células) del embrión en estado de segmentación tardío. **B.** Luego del inicio de la formación del sistema nervioso, las células que expresaban activamente el marcador fueron visualizadas mediante luz fluorescente. La tinción fluorescente es observada en células específicas que generan el cerebro anterior y el cerebro medio. **C.** Mapa de destino del sistema nervioso central del pez cebra. El marcador fue inyectado dentro de las células 6 horas después de la fecundación (izquierda) y el resultado es un código de colores sobre el pez nacido (derecha). Los colores superpuestos indican que las células desde estas regiones del embrión de 6 horas contribuyen a dos o más regiones. (**A, B** de Kozlowski y col. 1998; fotografía cortesía de E. Weinberg. **C**, según Woo y Fraser 1995.)

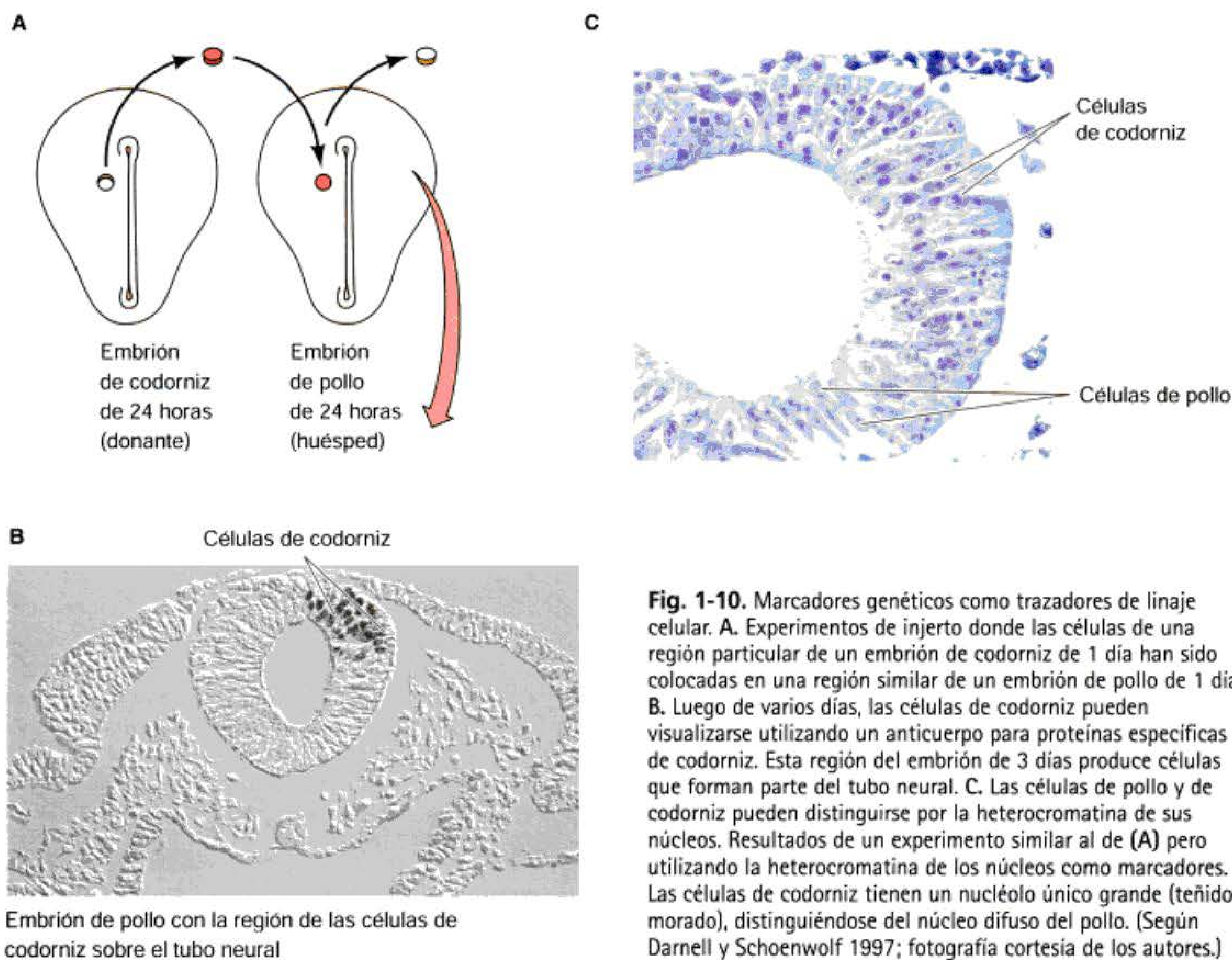


Fig. 1-10. Marcadores genéticos como trazadores de linaje celular. **A.** Experimentos de injerto donde las células de una región particular de un embrión de codorniz de 1 día han sido colocadas en una región similar de un embrión de pollo de 1 día. **B.** Luego de varios días, las células de codorniz pueden visualizarse utilizando un anticuerpo para proteínas específicas de codorniz. Esta región del embrión de 3 días produce células que forman parte del tubo neural. **C.** Las células de pollo y de codorniz pueden distinguirse por la heterocromatina de sus núcleos. Resultados de un experimento similar al de **(A)** pero utilizando la heterocromatina de los núcleos como marcadores. Las células de codorniz tienen un nucléolo único grande (teñido morado), distinguiéndose del núcleo difuso del pollo. (Según Darnell y Schoenwolf 1997; fotografía cortesía de los autores.)

heterocromatina de la codorniz en el núcleo está concentrada alrededor del nucléolo, haciendo que el núcleo de la codorniz sea fácilmente distinguible del núcleo del pollo. En segundo lugar, hay antígenos específicos de célula que son específicos de codorniz y que pueden utilizarse para encontrar células individuales de la codorniz, aun si ellas están en una población amplia de las células del pollo. De este modo, se han obtenido excelentes mapas de las estructuras del cerebro del pollo y del sistema esquelético (fig. 1-10; Le Douarin 1969; Le Douarin and Teillet 1973).

SITIO WEB 1.3 **La Dra. Nicole Le Douarin y las quimeras pollo-codorniz (Dr. Nicole Le Douarin and chick-quail chimeras).** Somos afortunados en presentar aquí una película realizada por la Dra. Le Douarin sobre sus injertos pollo-codorniz. Usted podrá ver cómo en realidad se hacen estos injertos.

VADE MECUM[2] **Histotécnicas (Histotechniques).** La mayoría de las células debe ser teñida con la finalidad de poder verla; diversos colorantes tiñen diferentes tipos de moléculas. Aquí se dan las instrucciones sobre tinción de células para observar estructuras específicas (tales como el núcleo).
[Hacer clic sobre Histotechniques]

Migración celular

Una de las contribuciones más importantes de los mapas de destino ha sido la demostración de una extensa migración celular durante el desarrollo. Mary Rawles (1940) demostró que las células pigmentadas (**melanocitos**) del pollo se originaban en la **cresta neural**, una banda transitoria de células que une el tubo neural con la epidermis. Cuando trasplantó pequeñas regiones de tejido que contenían cresta neural a partir de una estirpe pigmentada de pollos, a una posición semejante en embriones de una estirpe no pigmentada de pollos, las células pigmentadas en migración entraban en la epidermis y posteriormente lo hacían en las plumas (fig. 1-11A). Ris (1941) utilizó una técnica similar para mostrar que mientras casi todo el pigmento externo del embrión de pollo provenía de la migración de las células de la cresta neural, el pigmento de la retina era formado en la retina misma y no era dependiente de la migración de células de la cresta neural. Mediante la utilización de técnicas de marcación radiactiva, Weston (1963) demostró que la migración de las células de la cresta neural da origen a los melanocitos, así como a las neuronas periféricas y a la médula suprarrenal secretora de epinefrina (adrenalina) (fig. 1-11B, C). Este patrón fue confirmado en híbridos pollo-codorniz, en el que las células de la cresta neural de la codorniz produjeron su propio pigmento y patrón en las plumas del pollo. Más recientemente, la

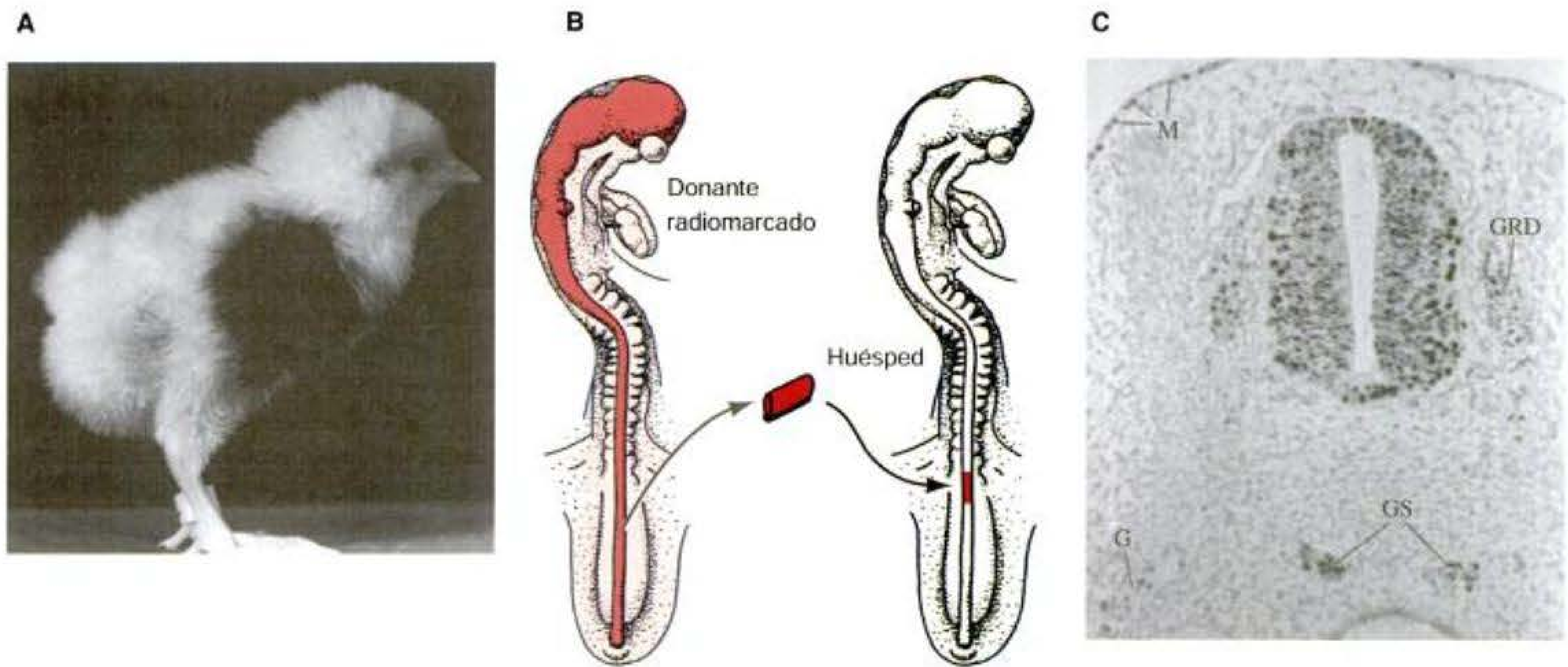


Fig. 1-11. Migración de las células de la cresta neural. **A.** Pollo obtenido como resultado del trasplante de la cresta neural de la región del tronco desde un embrión de una estirpe pigmentada de pollos hacia una región semejante de un embrión de una estirpe no pigmentada. Las células de la cresta neural que dan origen al pigmento han migrado hacia la epidermis del ala y de las plumas. **B.** Técnica para seguir a las células de la cresta neural utilizando tejido radiactivo. **C.** Radioautografía que muestra las localizaciones de las células de la cresta neural que han migrado desde las células donantes radiactivas. Estas células forman melanocitos formadores de pigmento (M), células de los ganglios neurales simpáticos (GS), células de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y células gliales (G). (**A**, fotografía original de los archivos de B. H. Willier; **B**, según Weston 1963; **C** cortesía de J. Weston.)

marca con colorantes fluorescentes ha permitido seguir el movimiento individual de las células de la cresta neural cuando ellas forman los linajes pigmentario, surprarrenal y neuronal (véase cap. 13).

Además del desplazamiento de las células pigmentadas, otra migración a gran escala incluye la que realizan las células germinales primordiales (que migran a partir de células del saco vitelino hacia las gónadas y forman el espermatozoide o el gameto femenino) y la de los precursores celulares sanguíneos (que en los vertebrados pasan por varias migraciones para colonizar el hígado y la médula ósea).

Embriología evolutiva

La teoría de la evolución de Charles Darwin reestructuró la embriología comparada y le dio un nuevo enfoque. Luego de la lectura del resumen de Johannes Müller acerca de las leyes de von Baer en 1842, Darwin vio que las semejanzas embrionarias podrían constituir un argumento muy fuerte a favor de las relaciones genéticas de los diferentes grupos de animales. "La comunidad de estructura embrionaria revela la comunidad de origen," él concluiría en su obra *Sobre el origen de las especies* en 1859.

No obstante antes de Darwin, las formas larvales habían sido usadas para la clasificación taxonómica. J. V. Thompson, por ejemplo, había demostrado que las larvas de percebes eran casi idénticas a las larvas de cangrejos, y por esta razón consideró a los percebes como artrópodos, no como moluscos (fig. 1-12; Winsor 1969). Darwin, un experto sobre la taxonomía de los percebes, celebró este hallazgo: "Incluso el ilustre Cuvier no había percibido que el percebe es un crustáceo, pero una mirada a esta larva nos muestra a ésta de una manera inequívoca". La interpretación evolutiva de las leyes de von Baer por Darwin estableció un paradigma que fue seguido durante muchas décadas, concretamente, las relaciones entre los grupos pueden ser descubiertas mediante el hallazgo de formas embrionarias o larvales comunes. Kowalevsky (1871) haría un descubrimiento similar (publicado en el libro de Darwin *El ascendiente del hombre*, 1874) en el que las larvas de tunicados tienen notocorda y bolsas faríngeas, y que ellas forman su tubo neural y otros órganos de un modo muy similar al del primitivo cordado *Anfioxo*. Los tunicados, otro enigma en los esquemas de clasificación (anteriormente colocados, junto con los percebes, entre los moluscos), encontraron de este modo un lugar entre los cordados.

Darwin además observó que los organismos embrionarios a veces generan estructuras que son inapropiadas para su forma adulta, pero que muestra sus relaciones con otros animales. Él indicó la existencia de ojos en los embriones de topo, rudimentos pélvicos en los embriones de víboras y dientes en los embriones de ballenas barbadas.

Darwin también sostuvo que las adaptaciones que se alejan "del tipo" y permiten a un organismo sobrevivir en su ambiente específico se desarrollan posteriormente en el embrión.* Observó que las diferencias

* Sin embargo, como fue observado en primer lugar por Weismann (1875), las larvas deben tener sus propias adaptaciones que les ayuden a sobrevivir. La mariposa de virrey adulta imita a la mariposa de monarca, pero la oruga de virrey no imita a la bella larva de monarca. En su lugar, la larva de virrey evita ser descubierta al parecerse a los excrementos de las aves (Begon y col. 1986).

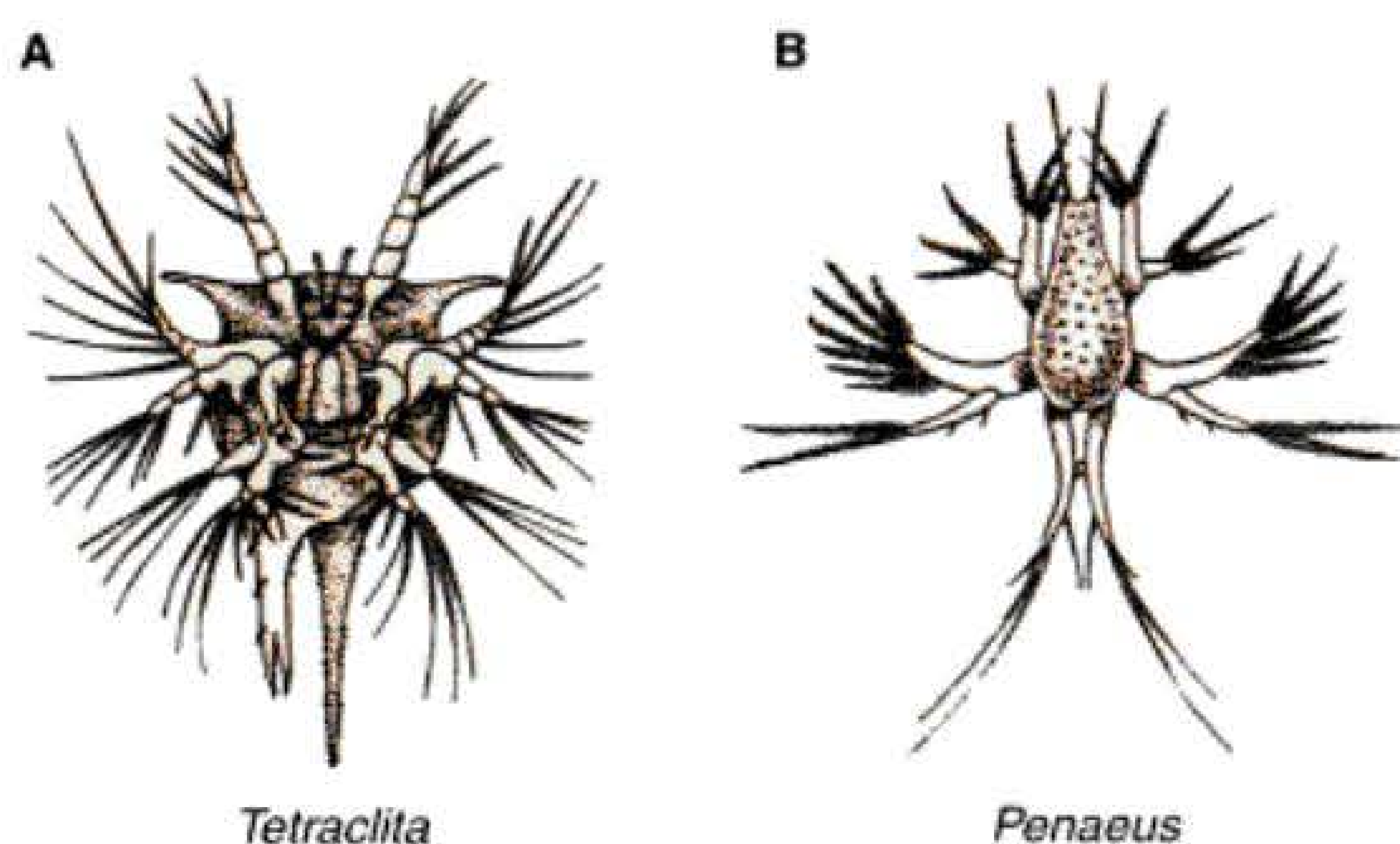


Fig. 1-12. Larvas nauplius de **A.** un percebe (*Tetraclita*, visto en su lado ventral) y **B.** de un camarón (*Penaeus*, visto en su lado dorsal). El camarón y el percebe comparten un estado larval similar a pesar de su radical divergencia en el desarrollo tardío. (Según Müller 1864.)

entre especies dentro de un género se hacen mayores cuando persisten en el desarrollo, tal como fue predicho por las leyes de von Baer. Debido a esto, Darwin reconoció dos modos de ver el "origen con modificación". Uno podría hacer énfasis sobre el origen común al señalar las semejanzas embrionarias entre dos o más grupos de animales, o uno podría resaltar las modificaciones por las que se muestra cómo el desarrollo fue alterado para producir estructuras que permitían a los animales adaptarse a una condición en particular.

Homologías embrionarias

Una de las distinciones más importantes hecha por los embriólogos evolutivos era la diferencia entre analogía y homología. Ambos términos se refieren a estructuras que parecen ser similares. Las estructuras **homólogas** son aquellos órganos cuyas semejanzas subyacentes son el resultado de haber sido derivados a partir de una estructura ancestral común. Por ejemplo, el ala de un ave y la extremidad anterior de un ser humano son homólogas. Además, sus respectivas regiones son homólogas (fig. 1-13). Las estructuras **análogas** son aquellas cuyas semejanzas se deben a que llevan a cabo una función similar, en lugar de ser derivadas a partir de un ancestro común. Por ejemplo, el ala de una mariposa y el ala de un ave son análogas; los dos tipos de alas comparten una función común (y por esta razón se denominan alas), pero el ala del ave y el ala del insecto no se originaron a partir de una estructura ancestral original común que se convirtió, modificada por la evolución, en las alas del ave y en las de la mariposa.*

Las homologías deben ser hechas cuidadosamente y deben referirse siempre al nivel de organización comparado. Por ejemplo, el ala de un ave y el ala de un murciélago son homólogas como extremidades anteriores, pero no como alas. En otras palabras, comparten una estructura subyacente común de huesos de la extremidad anterior, debido a que las aves y los mamíferos comparten un ancestro común. Sin embargo, el ala del ave se desarrolló de manera independiente del ala del murciélago. Los murciélagos descienden de una larga línea de mamíferos sin alas, y la estructura del ala del murciélago es marcadamente diferente de la del ave.

Uno de los casos más celebrados de las homologías embrionarias es la del cartílago branquial del pez, la mandíbula (maxilar) del reptil y el oído medio del mamífero (revisión en Gould 1990). En todos los vertebrados mandibulados, incluidos los peces, el primer arco faríngeo genera el aparato mandibular (maxilar). Las células de la cresta neural de este arco migran para formar el cartílago de Meckel, el precursor de la mandíbula (véase fig. 1-3). En los anfibios, reptiles y aves, la porción posterior de este cartílago forma el hueso cuadrado del maxilar superior y el hueso articular del maxilar inferior. Estos huesos se conectan entre sí y están involucrados en articular los maxilares superior e inferior. Sin embargo, en los mamíferos, esta articulación se produce en otra región (huesos escamoso y dentario), "liberando" así a estos elementos óseos para adquirir nuevas funciones.

El hueso cuadrado del maxilar superior de los reptiles evolucionó hasta el hueso del yunque del oído medio y el hueso articular del maxilar inferior de los reptiles llegó a ser nuestro martillo (Goodrich 1930; Wang y col. 2001). Este último proceso fue descrito inicialmente por Reichert en 1837, cuando observó en el embrión de cerdo que la mandíbula (hueso mandibular) se osificaba sobre el lado del cartílago de Meckel, mientras que la región posterior del cartílago de Meckel se osificaba, separándose del resto del cartílago, y entrando en la región del oído medio para llegar a ser el martillo (fig. 1-14).

Pero la historia no termina aquí. La porción superior del segundo arco embrionario en el que se apoyaba la branquia llegó a ser el hueso hiomandibular de los peces mandibulados. Este elemento sostiene el cráneo y une la mandíbula al cráneo (fig. 1-14A). Como los vertebrados se mueven sobre la tierra, tienen un nuevo problema: cómo oír en un medio tan delgado como el aire. El hueso hiomandibular casualmente está cerca de la cápsula ótica (oído) y el material óseo es excelente para transmitir sonidos. Debido a esto, mientras todavía funciona como una estructura de soporte del cráneo, el hueso hiomandibular de los primeros anfibios también comenzó funcionando como un transductor de sonidos (Clack 1989). Como los vertebrados terrestres alteraron su locomoción, estructura mandibular y postura, el cráneo llegó a estar firmemente unido al resto de la cabeza y no necesitó el soporte hiomandibular. El hueso hiomandibular pareció luego haberse especializado en el hueso del estribo del oído medio. La que había sido una función secundaria del hueso llegó a ser una función primaria.

Por esta razón, los huesos del oído medio de los mamíferos son homólogos al maxilar inferior posterior de los reptiles y a los arcos branquiales de los peces agnatos. En el capítulo 22 se detallará la información más reciente con respecto a la relación entre el desarrollo y la evolución.

* *Nota del traductor:* los tetrápodos se caracterizan por poseer cuatro extremidades, dos anteriores y dos posteriores. La denominación que reciben las extremidades con respecto a su posición espacial se refiere a la posición que ocupan con relación al eje longitudinal de estos organismos. En el caso del ser humano suelen recibir la denominación de extremidades superiores e inferiores respectivamente (anatomistas) basado en la bipedestación característica y en la posición erecta que éstos adoptan. Para el caso de este texto se utilizará el concepto de extremidad anterior y posterior ya que resulta de mayor utilidad para la comprensión de los conceptos que serán abordados.

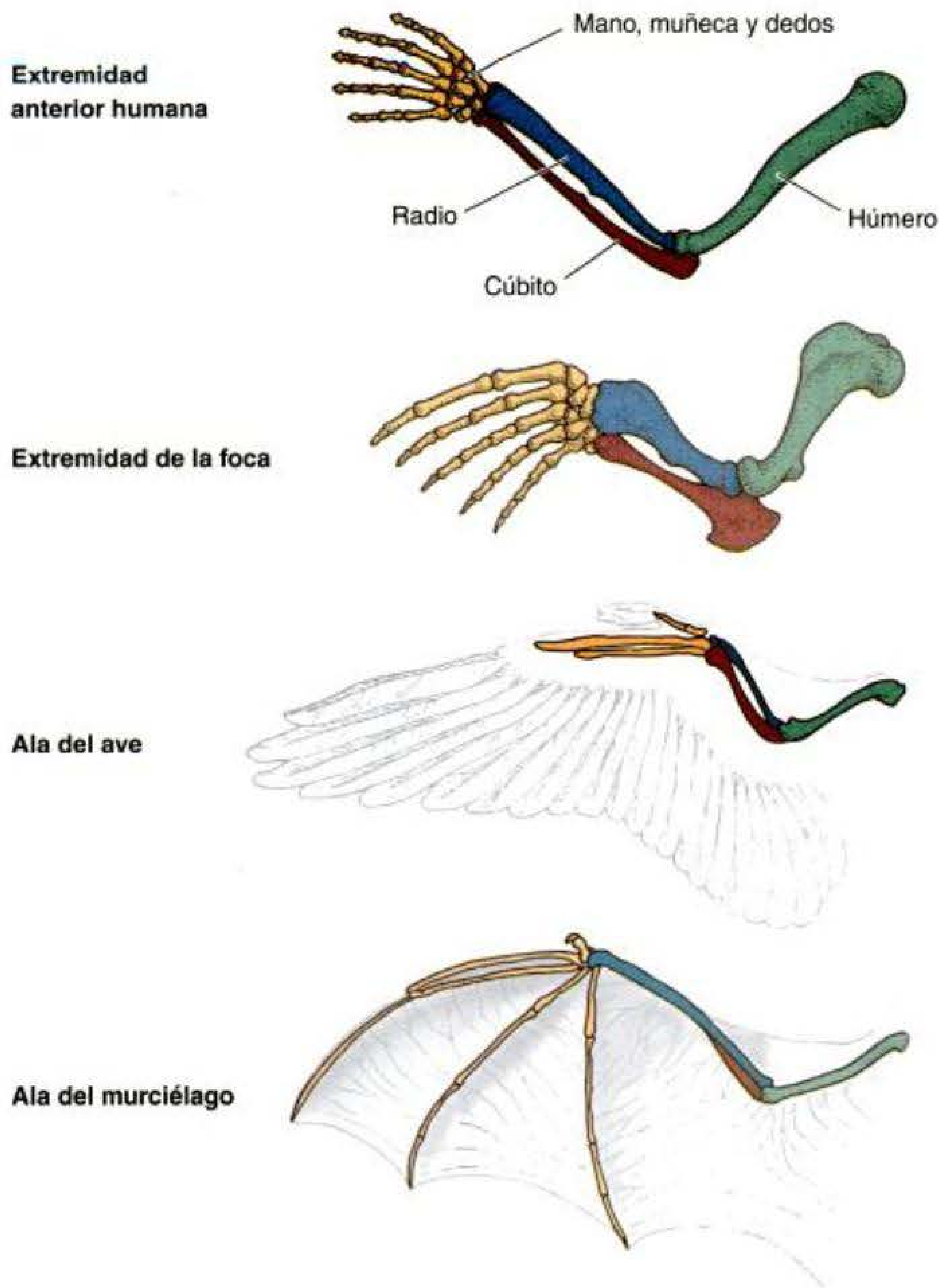


Fig. 1-13. Homologías de estructura entre un brazo humano, un extremo anterior de foca, un ala de ave y un ala de murciélago; las estructuras homólogas de soporte se muestran en el mismo color. Los cuatro son homólogos como extremidades anteriores y fueron derivados de un ancestro tetrápodo común. Las adaptaciones de las extremidades anteriores del ave y del murciélago para volar, sin embargo, evolucionaron independientemente una de otra, después que dos linajes divergieron de su ancestro común. Por lo tanto, como alas no son homólogas, pero sí análogas.

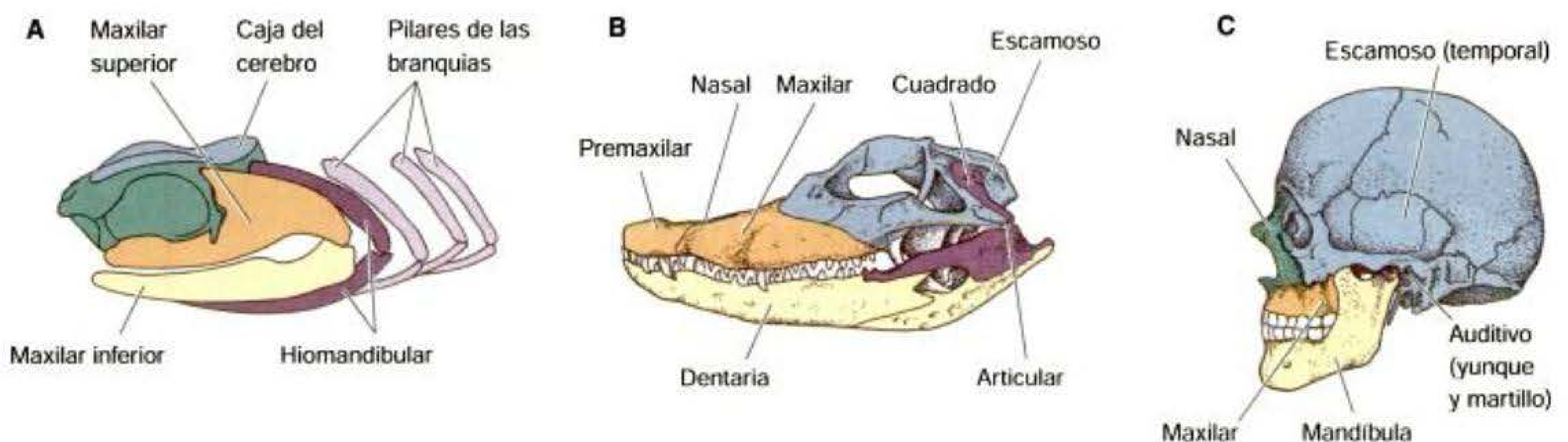


Fig. 1-14. Estructura de la mandíbula en el pez, reptil y mamífero. **A.** Homologías de mandíbulas y arcos branquiales tal como se ven en el cráneo de tiburón paleozoico *Cobedelus aculentes.* **B.** Vista lateral de un cráneo de caimán. La porción articular de la mandíbula inferior articula con el hueso cuadrado del cráneo. **C.** Vista lateral del cráneo humano, que muestra la unión de la mandíbula inferior con la región escamosa (temporal) del cráneo. En los mamíferos, el hueso cuadrado se vuelve interno para formar el yunque del oído medio. El hueso articular retiene su contacto con el cuadrado, transformándose en el martillo del oído medio. (A, según Zangerl y Williams 1975.)

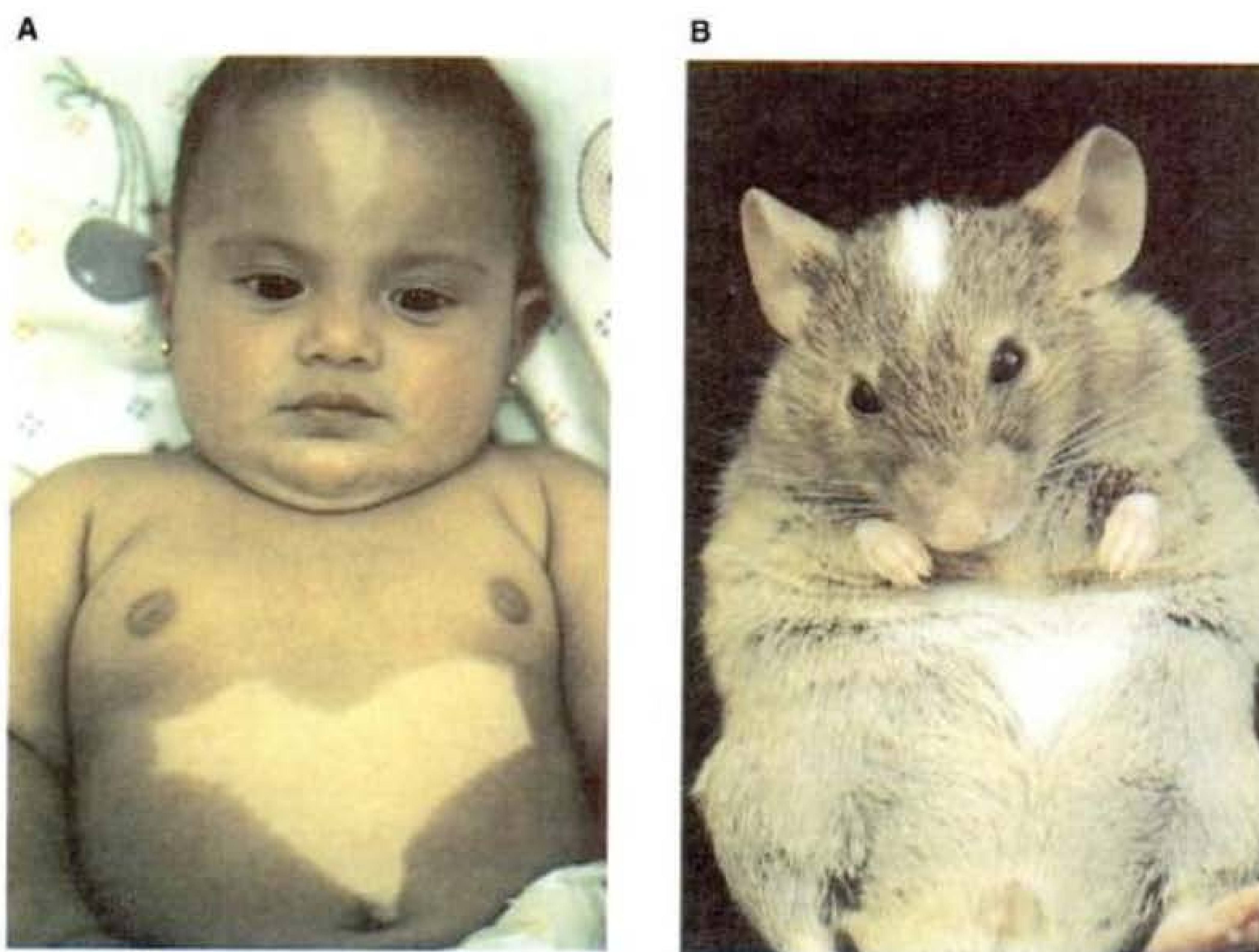


Fig. 1-15. Anomalías del desarrollo provocadas por mutación genética. **A.** Piebaldismo en un niño. Esta condición producida genéticamente genera esterilidad, anemia y regiones poco pigmentadas de la piel y el pelo, junto con un defectuoso desarrollo de las neuronas del intestino y el oído. El piebaldismo es causado por una mutación en el gen *KIT*. La proteína Kit es esencial para la proliferación y migración de las células de la cresta neural, precursores de la célula germinal y precursores de las células sanguíneas. **B.** Ratón piebáldico con una mutación en el gen *Kit*. Los ratones proporcionan importantes modelos para estudiar las enfermedades del desarrollo de los seres humanos. (Fotografía cortesía de R. A. Fleischman.)

Embriología médica y teratología

Mientras que los embriólogos podrían examinar embriones para describir la evolución de la vida y cómo los diferentes animales forman sus órganos, los médicos se llegaron a interesar en los embriones por razones más prácticas. Entre un 2 y un 5% de los niños humanos nace con una anomalía anatómica fácilmente observable (Thorogood 1997). Estas anomalías pueden incluir ausencia de miembros, dígitos extras o ausentes, hendidura del paladar, ojos que carecen de ciertas partes, corazón sin válvulas, etc. Los médicos necesitan conocer las causas de estas anomalías del desarrollo para, de este modo, poder aconsejar a los padres sobre el riesgo de tener otro niño malformado. Además, el estudio de las anomalías del desarrollo (alteraciones congénitas) puede decirnos cómo se forma normalmente el cuerpo humano. Ante la ausencia de datos experimentales sobre embriones humanos, a menudo debemos confiar en los "experimentos" de la naturaleza para aprender cómo el cuerpo humano se organiza.* Algunas anomalías del desarrollo son producidas por genes o cromosomas mutantes, y algunas son producidas por factores ambientales que dificultan el desarrollo.

Las anomalías provocadas por acontecimientos genéticos (mutaciones de genes, traslocaciones o aneuploidías cromosómicas) se denominan **malformaciones**. Las malformaciones aparecen frecuentemente como **síndromes** (del griego, "aparecer juntos"), en los que varias anomalías se presentan simultáneamente. Por ejemplo, una malformación humana llamada piebaldismo (albinismo localizado), mostrada en la figura 1-15A, es debida a una mutación dominante en un gen (*KIT*) sobre el brazo largo del cromosoma 4 (Spritz y col. 1992). El síndrome piebáldico incluye anemia, esterilidad, regiones de la piel y del pelo sin pigmentar, sordera y ausencia de neuronas que provoquen peristalsis en el intestino. La característica común subyacente a estas condiciones es que el gen *KIT* codifica una proteína que es expresada en las células de la cresta neural y en los precursores de las células sanguíneas y en las células germinales. La proteína Kit le permite a estas células proliferar. Sin esta proteína, las células de la cresta neural –que generan las células pigmentadas, algunas células del oído y las neuronas del intestino– no se multiplican tan ampliamente como lo deberían hacer (resultando en una disminución de la pigmentación, sordera y malformación intestinal), tampoco producen precursores de las células sanguíneas (resultando en anemia) o de las células germinales (resultando en esterilidad).

Los biólogos del desarrollo y los genetistas clínicos estudian a menudo los síndromes humanos (y determinan sus causas) a través del estudio de animales que presentan el mismo síndrome. Éstos son denominados **modelos animales** de las enfermedades; el modelo de ratón para el piebaldismo se muestra en la figura 1-15B. Éste tiene un fenotipo muy similar al de la condición humana, y es causado por una mutación en el gen *Kit* del ratón.*

* La palabra "monstruo", frecuentemente utilizada en los libros de texto previos a la mitad del siglo XX para describir a los niños malformados, proviene del latín *monstrare*, "mostrar o señalar". Ésta es también la raíz de la palabra inglesa *demonstrate* (mostrar). Fue Meckel (el del famoso cartílago de la mandíbula) quien se dio cuenta de que los síndromes de anomalías congénitas mostraban algunos principios sobre el desarrollo normal. Las regiones del cuerpo que estaban afectadas conjuntamente debían tener un origen o mecanismos de desarrollo común que estaban siendo afectados.

* Los genes *Kit* de ratón y *KIT* del ser humano son considerados homólogos por sus semejanzas estructurales y su supuesto ancestro común. Los genes humanos están escritos usualmente en itálica y con todas sus letras en mayúscula. Los genes de ratón están escritos en itálica, pero generalmente tienen solo la primera letra en mayúscula. Los productos de genes –proteínas– no llevan itálica. Si la proteína no tiene un criterio bioquímico o nombre fisiológico, generalmente se la representa con el nombre del gen en tipo romano, con la primera letra en mayúscula. Sin embargo, estas reglas frecuentemente no son respetadas. Uno recuerda la sentencia de Cohen (1982) que "los académicos son más proclives a compartir sus cepillos de dientes que la nomenclatura".

A



B

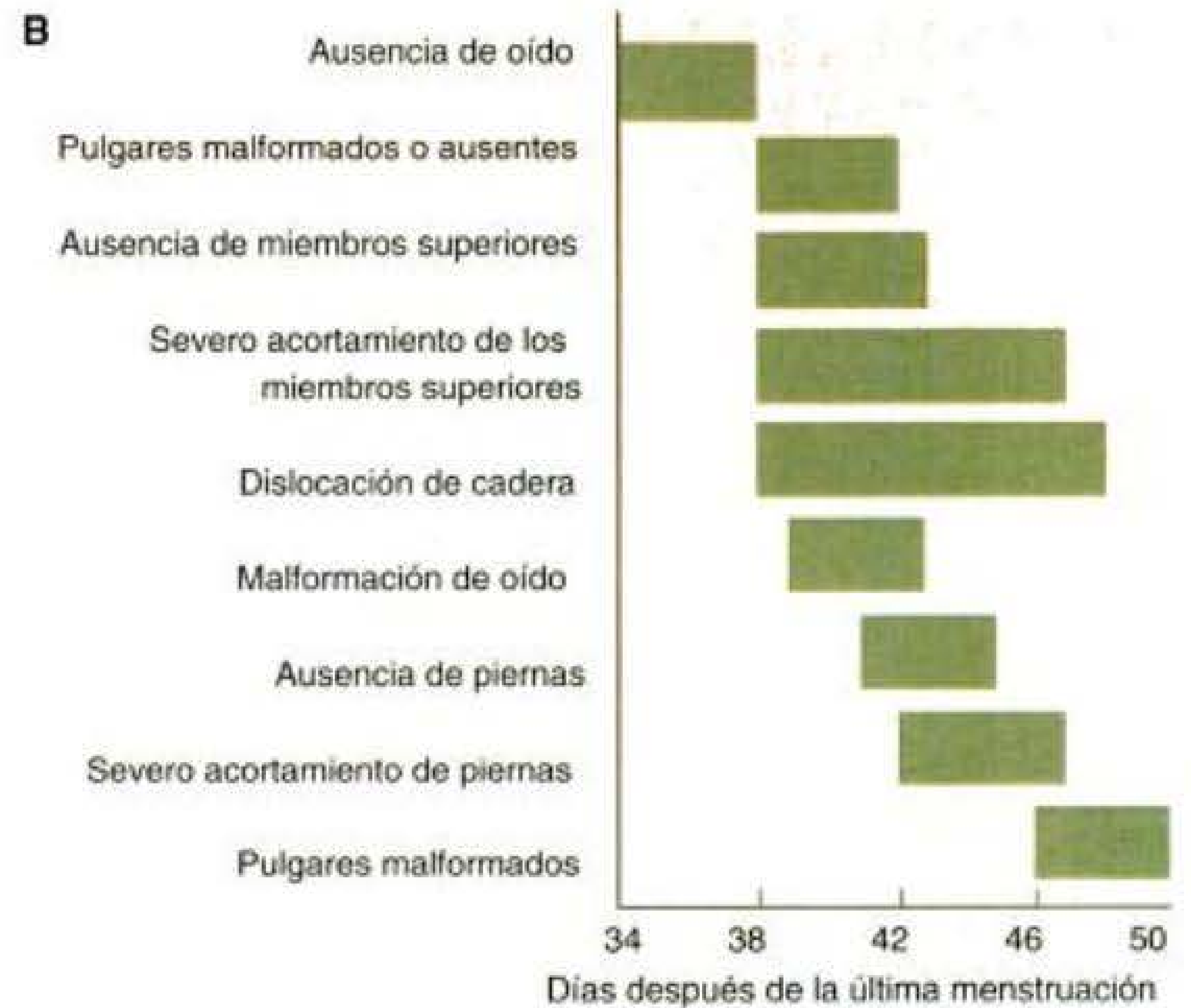


Fig. 1-16. Anomalías del desarrollo causadas por un agente ambiental. **A.** Focomelia, la falta de un desarrollo apropiado del miembro, fue el defecto al nacimiento más visible que ocurría en muchos niños de madres que tomaron la droga talidomida durante el embarazo. **B.** La talidomida interrumpe diferentes estructuras a diferentes tiempos del desarrollo humano. (Fotografía © Deutsche Presse/Archive Photos; **B**, según Nowack 1965.)

Las anomalías causadas por agentes exógenos (algunos agentes químicos o virus, radiación o hipertermia) son denominadas **disrupciones**. Los agentes responsables de estas alteraciones químicas son denominados **teratógenos** (griego, "monstruo-formadores"), y el estudio de cómo los agentes ambientales alteran el desarrollo normal se denomina **teratología**. Los teratógenos atrajeron la atención del público a comienzos de la década de 1960. En 1961, Lenz y McBride de manera independiente acumularon evidencia de que la droga talidomida, recetada como un sedante suave a numerosas mujeres embarazadas, provocó un gran aumento de un síndrome de anomalías congénitas que previamente era muy poco frecuente. La focomelia fue la anomalía más evidente, una condición en la que la longitud ósea de los miembros es deficiente o en casos extremos estos están ausentes (fig. 1-16A). Nacieron cerca de 7.000 niños afectados de mujeres que tomaron talidomida, y para producir niños con los cuatro miembros deformados una mujer necesitaba tan solo haber tomado una tableta (Lenz 1962, 1966; Toms 1962). Otras anomalías inducidas por la ingestión de esta droga incluyeron defectos cardíacos, ausencia de oídos externos e intestinos malformados.

Nowack (1965) documentó el período de susceptibilidad durante el cual la talidomida provocaba estas malformaciones. La droga fue hallada teratogénica solo durante los días 34-50 luego de la última menstruación (20-36 días posconcepción). La especificidad de la acción de la talidomida se muestra en la figura 1-16B. A partir del día 34 hasta el día 38, no se observan anomalías de los miembros. Durante este período, la talidomida puede provocar la ausencia o deficiencia de los componentes del oído. Las malformaciones de los miembros superiores se observan antes que las de los miembros inferiores, debido a que durante el desarrollo los brazos se forman un poco antes que las piernas. Los únicos modelos animales para la talidomida, sin embargo, son los primates, y todavía no sabemos para algunos de los mecanismos por qué esta droga provoca alteraciones en el desarrollo humano (aunque ésta parece trabajar mediante el bloqueo de algunas moléculas del mesodermo en desarrollo). La talidomida fue retirada del mercado en noviembre de 1961, pero se ha comenzado a recetar nuevamente (aunque no para las mujeres embarazadas), como una droga potencialmente antitumoral y anti-autoinmunitaria (véase cap. 21; Raje y Anderson 1999).

La integración de la información anatómica sobre las malformaciones congénitas con nuestro nuevo conocimiento acerca de los genes responsables del desarrollo ha tenido efectos revolucionarios y está reestructurando actualmente la medicina. Esta integración está permitiendo descubrir los genes responsables de las malformaciones heredadas, y esto posibilita identificar las etapas en el desarrollo que están siendo alteradas por teratógenos. Veremos ejemplos de esta integración a lo largo de este texto, y en el capítulo 21 se detallarán algunos de los nuevos descubrimientos destacables en teratología humana.

Modelado matemático del desarrollo

La biología del desarrollo ha sido descrita como el último refugio de los científicos matemáticamente incompetentes. Este fenómeno, sin embargo, no va a durar. Mientras que la mayoría de los embriólogos han estado satisfechos tratando de analizar instancias específicas del desarrollo o hasta formulando principios generales de embriología, algunos investigadores buscan ahora leyes cuantificables del desarrollo. El objetivo de estos investigadores es basar su embriología sobre matemática formal o principios físicos (véase Held 1992; Webster y Goodwin 1996; Salazar-Ciudad y col. 2000, 2001). La formación de patrones y el crecimiento son dos áreas en las que tales modelados matemáticos han ayudado a los biólogos a comprender algunas leyes subyacentes del desarrollo animal.

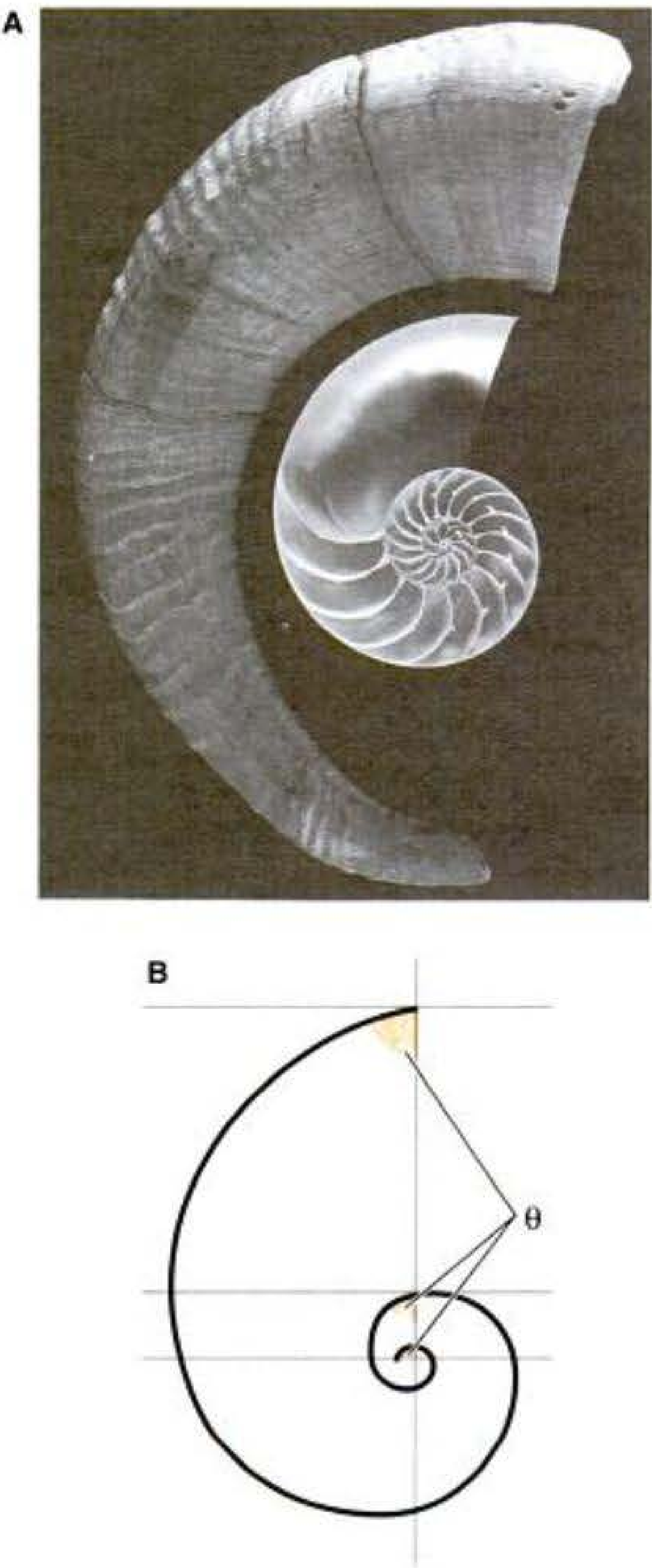


Fig. 1-17. Patrón de crecimiento espiral equiangular. **A.** El cuerno de un carnero y la concha de un *Nautilus pompilius* (acorazado o perlado) muestran crecimiento espiral equiangular. La concha del nautilus está cortada en una sección transversal. **B.** Análisis de René Descartes de un espiral equiangular, mostrando que si la curva corta cada vector de radio a un ángulo constante (simbolizado por θ), luego la curva crece continuamente sin cambiar alguna vez su forma. (A, del autor de la colección; B, según Thompson 1942.)

Las matemáticas del crecimiento del organismo

La mayoría de los animales crece aumentando su volumen mientras que conserva sus proporciones. Teóricamente, un animal que aumenta su peso (volumen) duplicándolo, incrementará su longitud solo 1,26 veces (es decir, $1{,}26^3 = 2$). W. K. Brooks (1886) observó que esta proporción era hallada con frecuencia en la naturaleza, y destacó que los artrópodos recogidos de alta mar por la expedición del *Challenger* aumentaban alrededor de 1,25 veces entre una muda y la otra. En 1904, Przibram y col. llevaron a cabo un estudio detallado sobre la mantis y encontraron que el incremento del

Cuadro 1-1 *Ángulo constante de una espiral equiangular y el ancho del radio entre las vueltas*

Ángulo constante	*Ancho del radio*[a]
90°	1,0
89°8′	1,1
86°18′	1,5
83°42′	2,0
80°5′	3,0
75°38′	5,0
69°53′	10,0
64°31′	20,0
58°5′	50,0
53°46′	10^2
42°17′	10^3
34°19′	10^4
28°37′	10^5
24°28′	10^6

Fuente: De Thompson 1942.
[a] El ancho del radio se calcula mediante la división del ancho de una vuelta por el ancho de la siguiente vuelta más grande.

tamaño entre dos mudas fue casi exactamente de 1,26 (véase Przibram 1931). Incluso las facetas hexagonales del ojo del artrópodo (que crece por expansión celular, no por división celular) se incrementan por este radio.

D'Arcy Thompson (1942) mostró de forma semejante que el crecimiento en espiral de las conchas (y de las uñas) puede ser expresado matemáticamente como $r = a^{\theta}$, y que el ancho del radio entre dos vueltas de una concha (caparazón) puede ser calculado mediante la fórmula $r = e^{2\pi \cot\theta}$ (fig. 1-17; cuadro 1-1). Así, si la vuelta fuera de 2,5 cm de ancho en un punto sobre el radio y el ángulo de la espiral fuera de 80°, la siguiente vuelta tendría una anchura de 7,5 cm en el mismo radio. La mayoría de los gasterópodos (caracol) y de los moluscos nautiloides tienen un ángulo de curvatura entre 80° y 85°.* Ángulos de curvaturas más bajos son vistos en algunas conchas (principalmente bivalvos) y son comunes en dientes y garras (o pinzas).

Este tipo de crecimiento, en el que la forma es conservada debido a que todos los componentes crecen al mismo ritmo, se denomina **crecimiento isométrico**. En muchos organismos, sin embargo, el crecimiento no es un fenómeno uniforme. Es obvio que hay algunos períodos en la vida de un organismo durante los cuales el crecimiento es más rápido que en otros. El crecimiento físico durante los 10 primeros años de vida de una persona es mucho más intenso que en los 10 años siguientes a la graduación de alguien en el colegio. Por otra

* Si el ángulo fuera 90°, la concha formará un círculo más que un espiral y el crecimiento se detendría. Sin embargo, si el ángulo fuera de 60° la siguiente vuelta sería de 1,2 metros en ese radio, y si el ángulos fuera de 17°, la siguiente vuelta ocuparía una distancia de unas 24.000 kilómetros. Curiosamente, el técnico de laboratorio en los estudios de la mantis de Przibram era Alma Mahler, la musa académica de la Viena de *fin de siecle*.

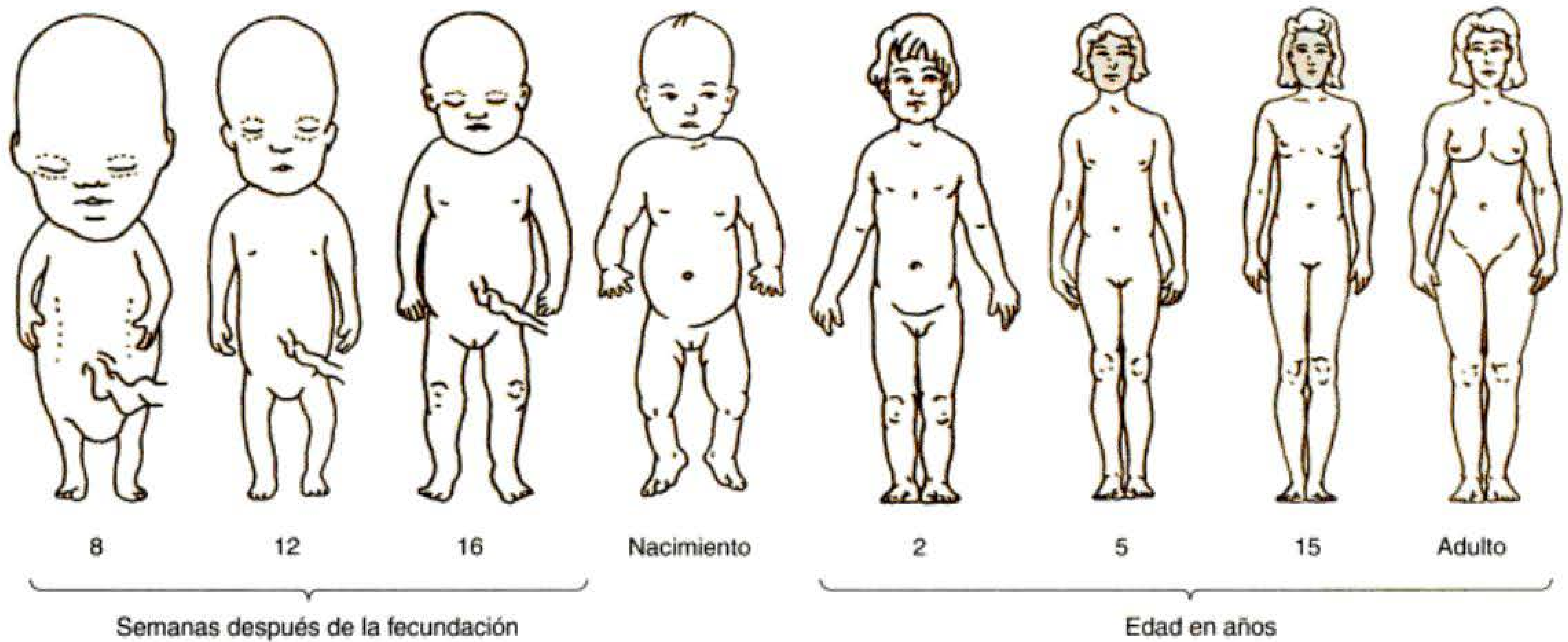


Fig. 1-18. Alometría en seres humanos. La cabeza del embrión es excesivamente larga en proporción al resto del cuerpo. Después del período embrionario, la cabeza crece más lentamente que el torso, manos y piernas. La alometría humana ha sido representada en el arte occidental y solo a partir del Renacimiento. Anteriormente, los niños se parecían a pequeños adultos. (Según Moore 1983.)

parte, todas las regiones del cuerpo no crecen a la misma velocidad. Este fenómeno de diferente velocidad de crecimiento de las partes dentro de un mismo organismo se denomina **crecimiento alométrico** (o **alometría**). La alometría humana es representada en la figura 1-18. Nuestros brazos y piernas crecen a mayor velocidad que nuestra cabeza y torso, de modo tal que las proporciones del adulto difieren significativamente de las de los niños. Julian Huxley (1932) comparó la alometría con depositar dinero en un banco en dos tasas de intereses continuas diferentes.

La fórmula para el crecimiento alométrico (o para comparar monedas invertidas a dos tasas de intereses diferentes) es $y = bx^{a/c}$, donde a y c representan las velocidades de crecimiento de las dos regiones del cuerpo, y b es el valor de y cuando $x = 1$. Si $a/c>1$, consecuentemente aquella parte del cuerpo representada por a está creciendo más rápido que aquella parte del cuerpo representada por c. En términos logarítmicos (que son más fáciles de graficar), $\log y = \log b + (a/c)\log x$.

Uno de los ejemplos más gráficos de crecimiento alométrico se observa en el cangrejo violinista macho, *Uca pugnax*. En los machos pequeños, las dos pinzas son de igual peso, constituyendo cada una de ellas cerca del 8% del peso total del cangrejo. Cuando el cangrejo crece, su tenaza (la pinza prensadora más grande) crece aún más rápidamente, constituyendo finalmente cerca del 38% del peso del cangrejo (fig. 1-19). Cuando estos datos son trazados sobre gráficos doble logarítmicos (con la masa corporal sobre el eje x y la masa de la pinza más grande sobre el eje y), se obtiene una línea recta cuya pendiente es el radio a/c. En el macho *Uca pugnax* (cuyo nombre es derivado de su enorme pinza), la proporción a/c es 6:1. Esto significa que la masa de la pinza más grande aumenta 6 veces más rápido que la masa del resto del cuerpo. En hembras de esta especie, las pinzas conservan a lo largo del desarrollo cerca del 8% del peso corporal. Esta alometría se produce únicamente en los machos (quienes usan esta pinza para defenderse y exhibirse).

Los recientes modelos sobre crecimiento isométrico y alométrico han tenido en cuenta los ritmos metabólicos, cambios en la historia de vida y proporción de muerte celular (véase West y col. 2001). Las relaciones entre los parámetros de crecimiento físico y genético y la coordinación de ritmos de crecimiento en todo el organismo sigue siendo un área fascinante que unifica el desarrollo con la fisiología y la medicina.

La matemática de los patrones

Uno de los modelos más importantes en biología del desarrollo fue formulado por Alan Turing (1952), uno de los fundadores de la ciencia informática (y el matemático que descifró el código alemán "Enigma" durante la Segunda Guerra Mundial). Él propuso un modelo en el cual dos soluciones distribuidas homogéneamente interactúan para producir patrones estables durante la morfogénesis. Estos patrones representan diferencias regionales en la concentración de dos sustancias. Sus interacciones producirían una estructura ordenada fuera del caos arbitrario.

El modelo de **reacción-difusión** de Turing involucra dos sustancias. La sustancia P promueve la producción de más sustancia P así como de sustancia S. La sustancia S, sin embargo, inhibe la producción de sustancia P. Las matemáticas de Turing muestran que si S se difunde más fácilmente que P, serán generadas ondas (elevaciones) agudas de diferencias de concentración para la sustancia P (fig. 1-20). Estas ondas han sido observadas en algunas reacciones químicas (Prigogine y Nicolis 1967; Winfree 1974).

El modelo de reacción-difusión predice áreas alternadas de alta y baja concentración de alguna sustancia. Cuando la concentración de una de estas sustancias se encuentra por encima de un cierto nivel umbral, una célula (o grupo de células) puede ser instruida a diferenciarse en alguna dirección. Una característica importante del modelo de Turing es que longitudes de onda química

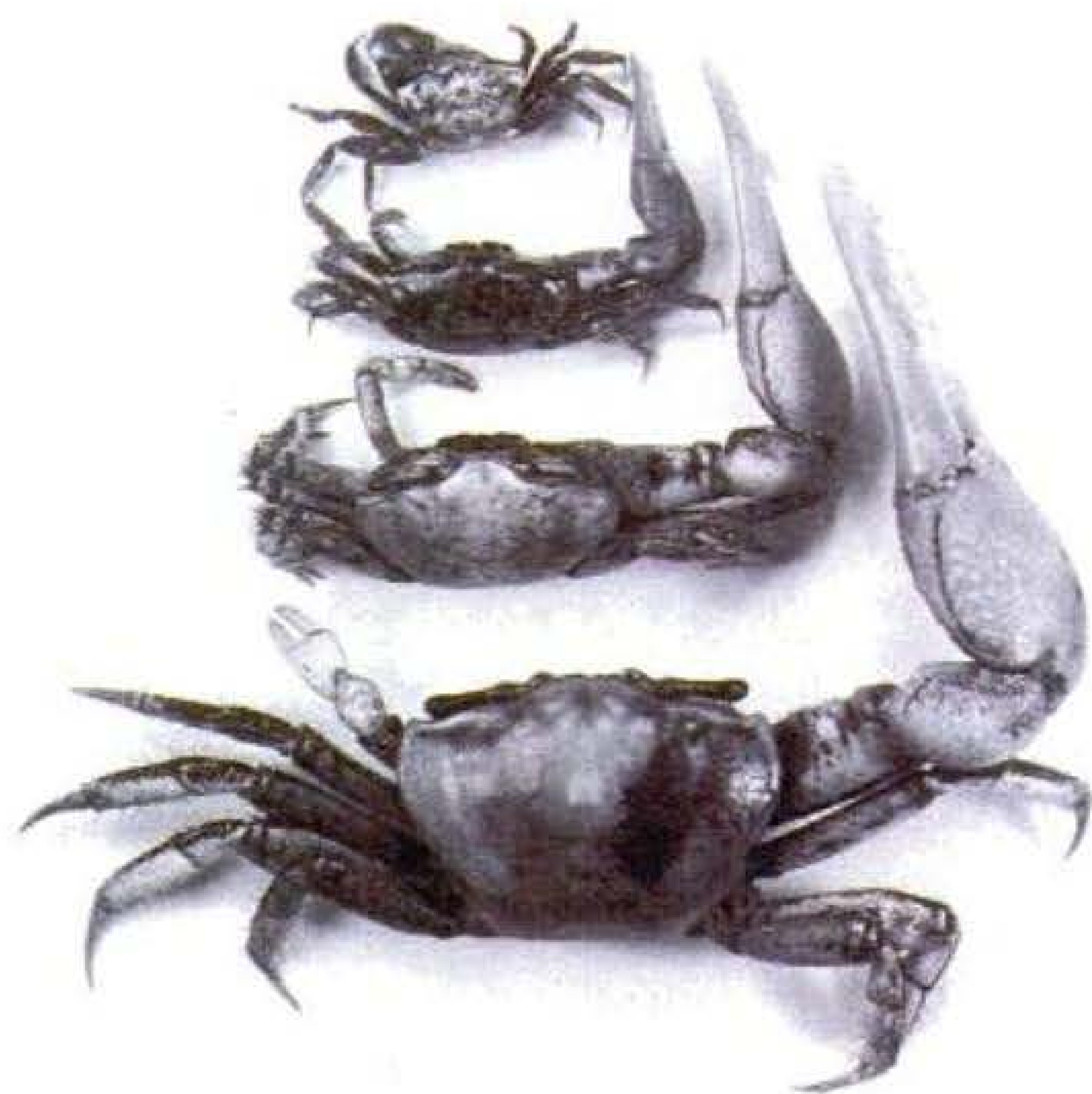


Fig. 1-19. Espécimen macho de cangrejo violinista, *Uca pugnax*. El crecimiento alométrico se produce únicamente en las pinzas de los machos. En las hembras (no mostrado), ambas pinzas conservan su crecimiento isométrico. (Fotografía cortesía del laboratorio Swarthmore College Marine Biology.)

específicas serán amplificadas, mientras que todas las otras serán suprimidas. Como las concentraciones locales de P aumentan, los valores de S generan un pico centrado sobre el pico de P, pero se vuelve más amplio y más bajo debido a que S tiene difusión más rápida. Este pico de S inhibe la formación de otro pico de P. ¿Pero cuáles picos de P sobrevivirán? Esto depende del tamaño y la forma de los tejidos en los que se produce la oscilación de la reacción. (Este patrón es análogo al de los armónicos de la vibración de las cuerdas, como en una guitarra. Solo algunas vibraciones de resonancia son permitidas, basadas en los límites de la cuerda.)

Las matemáticas, compuestas de complejas ecuaciones polinómicas, describen qué longitudes de onda específicas son seleccionadas. Tales funciones fueron utilizadas para modelar el patrón en espiral del moho mucilaginoso (del fango o del limo), la organización polar de los miembros y los patrones de los pigmentos en los mamíferos, peces y caracoles (figs. 1-21 y 1-22; Kondo y Asai 1995; Meinhardt 1998). Una simulación por computadora basada en el sistema de reacción-difusión de Turing, considerando las formas de partida y los tamaños de los elementos implicados, puede reproducir con éxito tales modelos.

Un camino para investigar las predicciones químicas mediante el modelo de Turing es encontrar las mutaciones genéticas en las que la estructura ordenada de un patrón se ha visto alterada. Los alelos tipo salvaje de estos genes pueden ser responsables de la generación del patrón normal. Uno de estos candidatos es el gen *leopard* (leopardo) del pez cebra (Asai y col. 1999). El pez cebra en general, tiene cinco bandas paralelas a lo largo de sus flancos. Sin embargo, en las diferentes mutaciones, las bandas están entrecortadas transformándose en manchas (o lunares) de diferentes tamaños y densidades. La figura 1-22 muestra un pez homocigota para cuatro alelos diferentes del gen *leopard*. Si el gen *leopard* codifica una enzima que cataliza una de las reacciones del sistema de

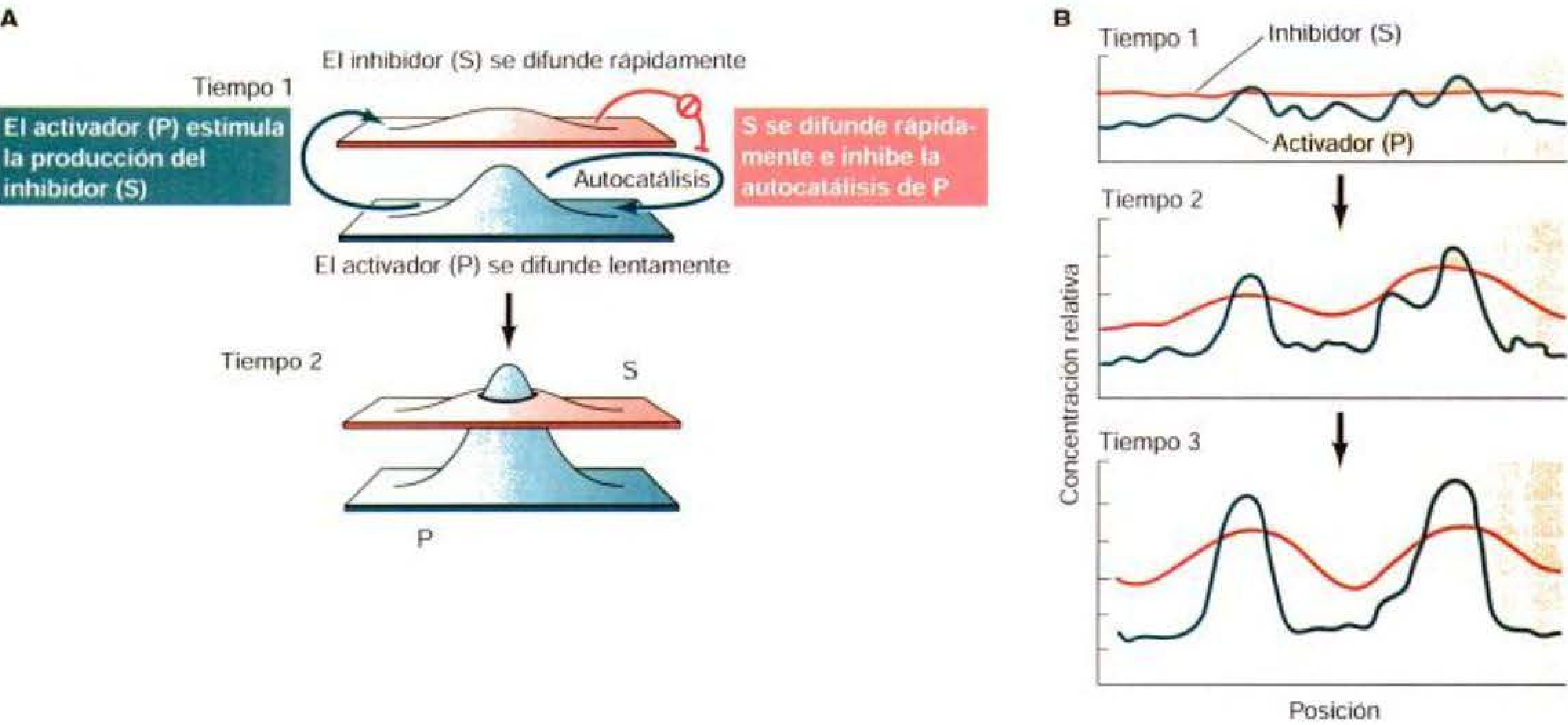


Fig. 1-20. Generación de patrón en el sistema reacción-difusión (modelo de Turing). La generación de heterogeneidades espaciales periódicas puede producirse espontáneamente cuando dos reactantes, S y P, se mezclan juntos en condiciones tales que S inhibe a P, P cataliza la producción de S y P, y S se difunde más rápido que P. **A.** Las condiciones del sistema de reacción-difusión producen en el mismo lugar un pico de P y un pico más bajo de S. **B.** La distribución de los reactantes es inicialmente al azar y sus concentraciones fluctúan en un determinado rango. Como P se incrementa localmente, éste produce más S, que se difunde para inhibir más picos de P que se forman en la vecindad de su producción. El resultado es una serie de picos de P ("olas sostenidas") a intervalos regulares.

reacción-difusión, las diferentes mutaciones de este gen pueden cambiar la cinética de la síntesis o degradación. En efecto, todos los patrones mutantes (y aquellos de sus heterocigotas) pueden ser generados por computadora mediante el cambio de un único parámetro en la ecuación de reacción-difusión. La clonación de estos genes debería permitir la cooperación adicional entre la biología teórica y la anatomía del desarrollo.

SITIO WEB 1.4 **Los antecedentes matemáticos de la formación de patrones (The mathematical backgound of pattern formation).** Las ecuaciones que modelan la formación del patrón son una serie de derivados parciales que representan índices de la síntesis, de la degradación y de la difusión de las moléculas del activador y del inhibidor.

SITIO WEB 1.5 **¿Cómo hace el pez cebra (y el pez ángel) para obtener sus bandas? (How do zebras (and angelfish) get their stripes?)** Nadie lo sabe con certeza, pero la adición de las ecuaciones de Turing que se conocen sobre la embriología del equino permite modelar cómo cada una de las tres especies conocidas de cebra adquieren su patrón único de bandas. Del mismo modo, cambiando alguno de los parámetros de la ecuación de Turing se pueden predecir los diferentes patrones de pigmentación del pez ángel.

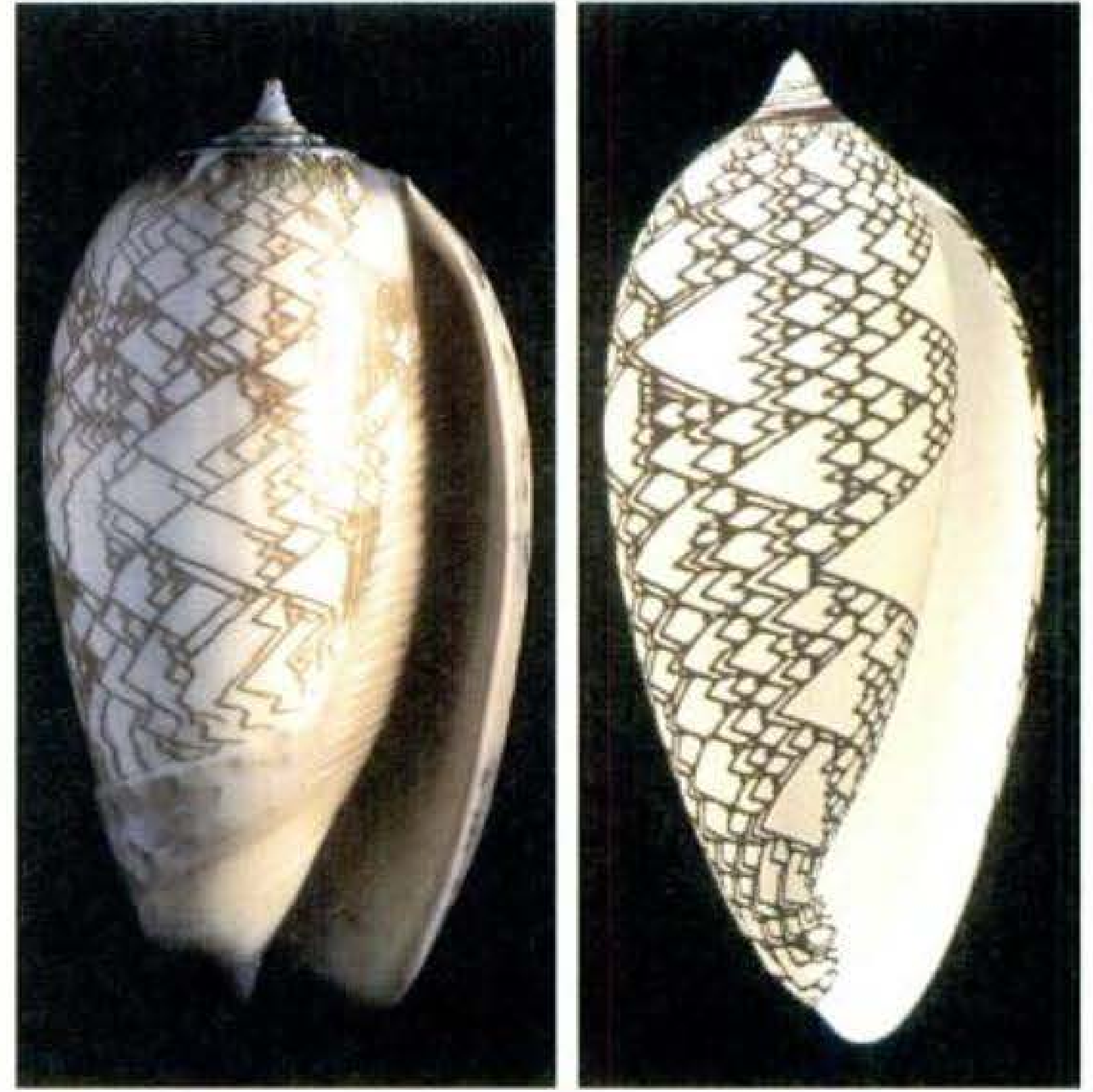


Fig. 1-21. Fotografía de un caracol *Oliva porphyria* (izquierda), y un modelo por computadora del mismo caracol (derecha) en el que los parámetros de crecimiento de la concha y de su patrón de pigmentación fueron generados matemáticamente. (De Meinhardt 1998; imagen de computadora cortesía de D. Fowler, P. Prusinkiewicz y H. Meinhardt.)

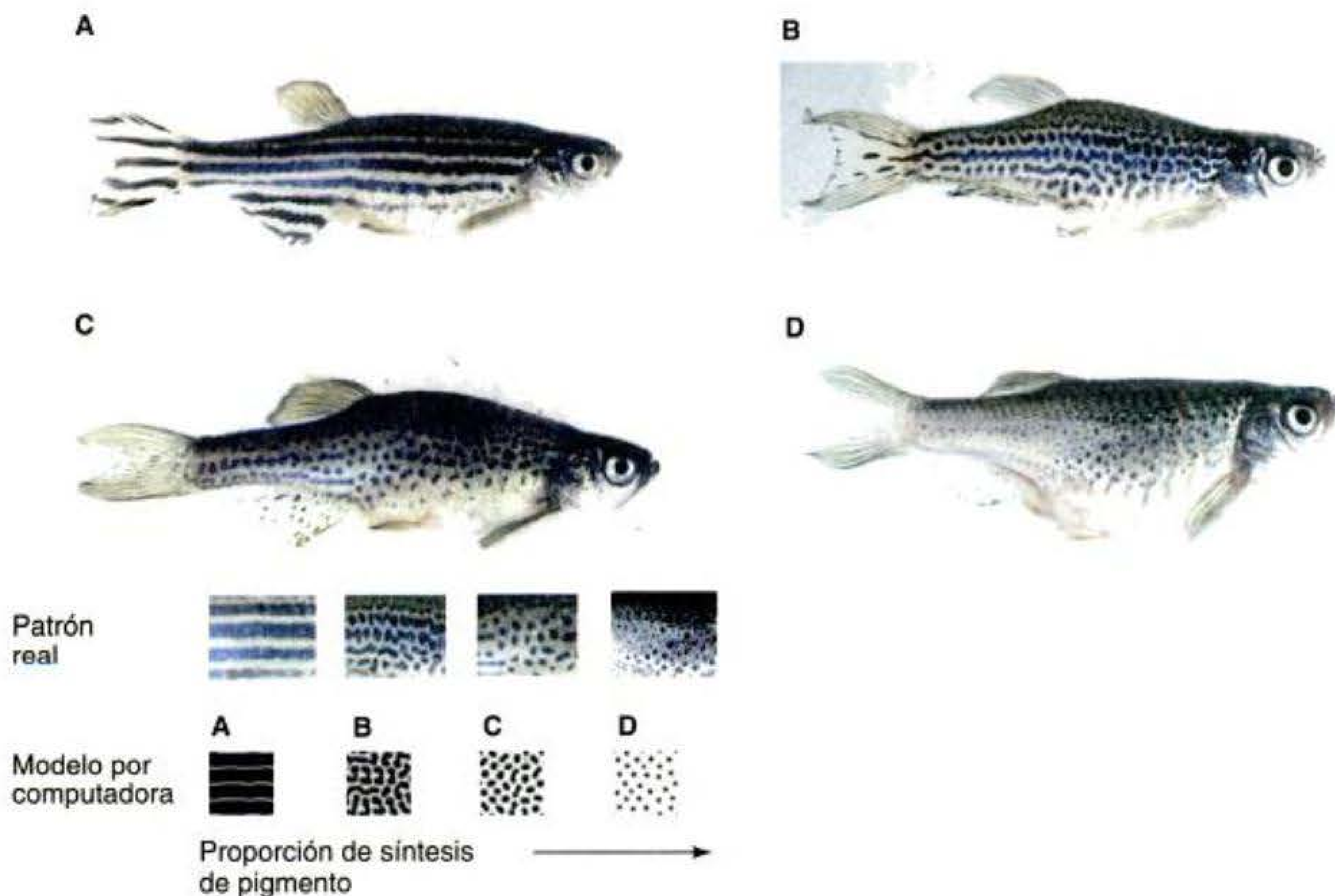


Fig. 1-22. Patrones de pigmentos del pez cebra homocigota para el alelo tipo salvaje (A) y para tres alelos mutantes diferentes (B–D) del gen *leopard*. Debajo se muestran simulaciones por computadora de los patrones de pigmento. Las letras corresponden a los fenotipos del pez en los paneles superiores. Cambiando un único parámetro de la ecuación de reacción-difusión se produce un cambio en el patrón. Cuando los valores de estos parámetros llegan a ser más grandes, las bandas se rompen en manchas, las cuales se vuelven más pequeñas y menos densas. (De Asai y col. 1999; fotografía cortesía de S. Kondo.)

Principios de desarrollo: anatomía del desarrollo

1. Los organismos deben funcionar mientras forman sus órganos. Tienen que utilizar un conjunto de estructuras mientras construyen otras.

2. La pregunta principal del desarrollo es ¿cómo se convierte la célula huevo en un adulto? Esta pregunta puede separarse en los problemas que forman parte de la diferenciación (¿cómo las células llegan a ser diferentes una de la otra y a partir de sus precursores?), morfogénesis (¿cómo se genera una forma ordenada?), crecimiento (¿cómo se regula el tamaño?), reproducción (¿cómo una generación da origen a otra generación?), evolución (¿cómo pueden los cambios en el proceso de desarrollo dar origen a nuevas estructuras anatómicas?) y ambiental (¿cómo afectan las condiciones físicas y químicas del ambiente el desarrollo de un organismo?).

3. Se produce la epigénesis. Nuevos organismos son creados de *novo* en cada generación a partir del citoplasma relativamente desordenado de la célula huevo.

4. La preformación no se encuentra en la estructura anatómica, sino en las instrucciones para formarlas. La herencia de la célula huevo incluye los potenciales genéticos del organismo.

5. Las instrucciones nucleares preformadas incluyen la habilidad para responder a estímulos ambientales en direcciones específicas.

6. El ectodermo da origen a la epidermis, al sistema nervioso y a las células pigmentadas.

7. El mesodermo genera el riñón, las gónadas, el músculo, los huesos, el corazón y las células sanguíneas.

8. El endodermo forma el revestimiento del tubo digestivo y del sistema respiratorio.

9. Los principios de Karl von Baer sostienen que las características generales de un grupo más grande de animales aparecen más temprano en el embrión que las características especializadas de un grupo pequeño. Cuando cada embrión de una especie dada se desarrolla, esta especie diverge de la forma adulta de otras especies. El embrión temprano de una especie animal "superior" no es como el adulto de un animal "inferior".

10. Células marcadas con colorantes muestran que algunas células se diferencian en el lugar en el que se forman, mientras que otras migran a partir de su sitio original y se diferencian en sus nuevas localizaciones. Las células que migran incluyen las células de la cresta neural y los precursores de las células germinales y de las células sanguíneas.

11. "La comunidad de estructura embrionaria revela la comunidad de origen" (Charles Darwin, *Sobre el origen de las especies*).

12. Las estructuras homólogas en diferentes especies son aquellos órganos cuya similitud es debida a que comparten una estructura ancestral común. Las estructuras análogas son aquellos órganos cuya similitud viene del hecho de servir a una función similar (pero que no deriva a partir de una estructura ancestral común).

13. Las anomalías congénitas pueden ser causadas por factores genéticos (mutaciones, aneuploidías, traslocaciones) o por agentes ambientales (algunos químicos, algunos virus, radiación).

14. Los síndromes consisten en un grupo de anomalías del desarrollo que "aparecen juntas".

15. Los órganos que están relacionados en los síndromes de desarrollo comparten además un origen común o un mecanismo común de formación.

16. Si el crecimiento es isométrico, una duplicación en el peso causará una expansión de 1,26 en la longitud.

17. El crecimiento alométrico puede generar cambios significativos en la estructura de los organismos.

18. Los patrones complejos pueden ser autogenerados por los eventos de reacción-difusión, donde el activador de un fenómeno local estimula la producción de más de sí mismo así como la producción de un factor inhibidor más difusible.

Bibliografía citada

Aristotle. ca. 350 B.C.E. Metaphysics. Book 1, PartDarwin, C. 1874. T. 2. D. Ross (trans.). Oxford University Press, New Selection in Relation York, 1979.

Aristotle. ca. 350 B.C.E. The Generation of Goodrich, E. S. 1930. Animals. A. L. Peck (trans.); G. P. Goold (ed.). and Development of Harvard University Press, Cambridge, MA, London. 1990.

Asai, R., E. Taguchi, Y. Kume, M. Saito and S. Kondo. 1999. Zebrafish Leopard gene as a component of the putative reaction-diffusion system. Mech. Dev. 89: 87-92.

Begon, M., T. L. Harper and C. R. Townsend. 1986. Ecology: Individuals, Populations, and Communities. Blackwell Scientific, Oxford.

Bonnet, C. 1764. Contemplation de la Nature. Marc-Michel Ray, Amsterdam.

Brooks, W. K. 1886. Report in the Stomatopoda collected by H M S Challenger. Challenger Reports 16: 1-114.

Carlson, B. M. 1981. Patten's Foundations of Embryology McGraw-Hill, New York.

Cassirer, E. 1950. Developmental mechanics and the problem of cause in biology. In E. Cassirer (ed.), The Problem of Knowledge. Yale University Press, New Haven.

Churchill, A. 1991. The rise of classical descriptive embryology. In S. F. Gilbert (ed), A Conceptual History of Modern Embryology, Plenum Press, New York, pp. 1-29.

Clack, J. A. 1989. Discovery of the earliest known tetrapod stapes. Nature 342: 425-427.

Cohen, M. M Jr. 1982. The Child with Multiple Birth Defects. Raven, New York.

Conklin, E. G. 1905. The organization and cell lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci Phila. 13: 1-119.

Darnell, D. K. and G. C. Schoenwolf. 1997. Modern techniques for labeling in avian and murine embryos. In G. P. Daston (ed.), Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 231-272.

Darwin, C. 1859. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray, London.

Darwin, C. 1874. The Descent of Man, and to Sex. 2nd Ed. John Murray, London.

Goodrich, E. S. 1930. Studies on the Structure and Development of Vertebrates. Macmillan, London.

Gould, S. J. 1977. Ontogeny and Phylogeny. Belknap Press. Cambridge. MA.

Gould, S. J. 1990. An earful of jaw. Nat. Hist. 1990(3): 12-23.

Harvey, W. 1651. Exercitationes de generatione animalium: quibus accedunt quaedum de partu, de membranis ac humoribus uteri et de conceptione. London.

Held, L. I., Jr. 1992. Models for Embryonic Periodicity. Karger, New York.

Huxley, J. S. 1932. Problems of Relative Growth. Dial Press New York.

Kolreuter, J. G. 1766. Vorlaufige Nachricht von einigen das feschlecht der Planzen betreffenden Versuchen und Beobachtung, nebst Fortset-zungen, 1, 2, 3.

Kondo, S. and R. Asai. 1995. A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish Pomaranthus. Nature 376: 765-768.

Kowalevsky, A. 1871. Weitere Studien II. Die Entwicklung der einfachen Ascidien. Arch. Micr. Anat. 7: 101-130.

Kozlowski, D. J., T. Muramaki, R. K. Ho and E. S. Weinberg. 1998. Regional cell movement and tissue patterning in the zebrafish embryo revealed by fate mapping with caged fluorescein. Biochem. Cell Biol. 75: 551-562.

Le Douarin, N. M. 1969. Particularités du noyau interphasique chez la Caille japonaise (Coturnix coturnix japonica). Utilisation de ces particularités comme "marquage biologique" dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogenèse. Bull. Biol. Fr. Belg. 103: 435-452.

Le Douarin, N. M. and M.-A. Teillet. 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 30: 31-48.

Lenoir, T. 1980. Kant, Blumenbach, and vital materialism in German biology. Isis 71:77-108.

Lenz, W. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 1: 45 (reported in a symposium in 1961.)

Lenz, W. 1966. Malformations caused by drugs in pregnancy. Am. J. Dis. Child. 112: 99-106.

Lillie, F. R. 1908. The Embryology of the Chick. Henry Holt, New York.

Maitre-Jan, A. 1722. Observations sur la formation du poluet. L. d'Houdry, Paris.

Malpighi, M. 1672. De Formatione Pulli in Ovo (London). Reprinted in H. B Adelmannm, Marcello Malpighi and the Evolution of Embryology. Cornell University Press, Ithaca; NY, 1966.

McBride, W. G. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 2: 1358.

Meinhardt, M.1998. The Algorhythmic Beauty of Sea Shells. Springer, Berlin.

Moore, K. L. 1983. The Developing Human. 3rd Ed. Saunders, Philadelphia.

Muller, F. 1864. Für Darwin. Engelmann, Leipzig.

Nishida, H. 1987. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue-restricted stage. Dev. Biol. 121: 526-541.

Nowack, E. 1965. Die sensible Phase bei der Thalidomide-Embryopathie. Humangenetik 1: 516-536.

Pander, C. 1817. Beiträge zur Entwickelungsgeschichte des Hünchens im Eye. Bronner, Würzburg.

Patten, B. M. 1951. The Early Embryo of the Chick. 4th Ed. McGraw-Hill, New York.

Pinto-Correia, C. 1997. The Ovary of Eve. University of Chicago Press, Chicago.

Prigogine, I. and G. Nicolis. 1967. On symmetry-breaking instabilities in dissipative systems. J. Chem. Phys. 46: 3542-3550.

Przibram, H. 1931. Connecting Laws in Animal Morphology. University of London Press, London.

Raje, N. and K. Anderson. 1999. Thalidomide: A revival story. New Engl. J. Med. 341: 1606-1609.

Rawles, M. E. 1940. The pigment forming potency of early chick blastoderm. Proc. Natl. Acad. Sci USA 26: 86-94.

Reichert, C. B. 1837. Entwickiungsgeschichte der Gehörknöchelchen der sogenannte Meckelsche Forsatz des Hammers. Muller's Arch. Anat. Phys. Wissensch. Med. 177-188.

Reverberi, G. and A. Minganti. 1946. Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine spermentale sul-l'ouvo di Ascidiella aspersa e di Ascidia malaca allo stadio di 8 blastomeri. Pubbl. Staz Zool. Napoli 20: 199-252.

Richardson, M. K., J. Hanken, L. Selwood, G. M. Wright, R. J. Richards, C. Pieau and A. Raynaud. 1998. Haeckel, embryos, and evolution. Science 280: 983-984.

Ris, H. 1941. An experimental study of the origins of melanophores in birds. Physiol. Zool. 14: 48-66.

Roe, S. 1981. Matter, Life, and Generation: Eighteenth-Century Embryology and the Haller-Wolff Debate. Cambridge University Press, Cambridge.

Rosenquist, G. C. 1966. A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm. Development from primitive streak stages to stage 12. Contrib Embryol. Carnegie Inst. 38: 71-110.

Salazar-Ciudad, I., J. Garcia-Fernandez and R. V. Sole. 2000. Gene networks

capable of pattern formation: from induction to reaction-diffusion. J. Theor. Biol. 205: 587-603.

Salazar-Ciudad, I., S. A. Newman and R. V. Sole. 2001. Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks. I. Emergence of patterns and genotype-phenotype relationships. Evol. Dev. 3: 84-94.

Spritz, R.A., S. A. Holmes, R. Ramesar, J. Greenberg, D. Curtis and P. Beighton. 1992. Mutations of the KIT (mast/stem celi growth factor receptor) proto-oncogene account for a continuous range of phenotypes in human piebaldism. Am. J. Hum. Genet. 51: 1058-1065.

Thompson, D. W. 1942. On Growth and Form. Cambridge University Press, Cambridge.

Thorogood, P. 1997. The relationship between genotype and phenotype: Some basic concepts. In P. Thorogood (ed.), Embryos, Genes, and Birth Defects. Wiley, New York, pp. 1-16.

Toms, D. A. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 2: 400.

Turing, A. M. 1952. The chemical basis of morphogenesis. Philos. Trans. R. Soc. Lond. [B] 237: 37-72.

Vogt, W. 1929. Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit ortlicher Vitalfärbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org 120: 384-706.

von Baer, K. E. 1828. Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion. Borntrager, Konigsberg.

Wang, Y., Y. Hu, J. Meng and C. Li. 2001. An ossified Meckel's cartilage in two Cretaceous mammals and origin of the mammalian middie ear. Science 294: 357-361.

Webster, G. and B. Goodwin. 1996. Form and Transformation: Generative and Relational Principles in Biology. Cambridge University Press, Cambridge.

Weismann, A. 1875. Uber den Saison Dimorphismus der Schmetterlinge. In Studien zur Descendenz-Theorie. Engelmann, Leipzig.

West, G. B., J. H. Brown and B. J. Enquist. 2001. A general model for ontogenetic growth. Nature 413: 628-630.

Weston, J. 1963. A radiographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. Dev. Biol. 6: 274-310.

Winfree, A. T. 1974. Rotating chemical reactions. Sci. Am. 230(6): 82-95.

Winsor, M. P. 1969. Barnacle larvae in the nine-teenth century: A case study in taxonomic theory. J. Hist. Med. Allied Sci. 24: 294-309.

Wolff, K. F. 1767. De formatione intestinorum praecipue. Novi Commentarii Academine Scientarum Imperialis Petropolitanae 12:403-507.

Woo, K. and S. E. Fraser. 1995. Order and coherence in the fate map of the zebrafish embryo. Development 121: 2595-2609.

Zangerl, R. and M. E. Williams. 1975. New evidence on the nature of the jaw suspension in Paleozoic anacanthus sharks. Paleontology 18: 333-341.

Capítulo 2 Ciclos de vida y la evolución de los patrones de desarrollo

El punto de vista tenido en cuenta aquí es que el ciclo de vida es la unidad central en biología... La evolución entonces se convierte en la alteración de los ciclos vitales a lo largo del tiempo; la genética, en los mecanismos de la herencia entre los ciclos y, el desarrollo, en todas las modificaciones que se producen en la estructura que tienen lugar durante un ciclo vital.

J. T. BONNER (1965)

Éste es el ciclo de vida
Y éste se mueve en torno a todos nosotros.

TIM RICE (1994)

LOS MODOS TRADICIONALES DE CLASIFICAR A LOS ANIMALES los catalogan según su estructura adulta. Pero, como señaló J. T. Bonner (1965), éste es un método muy artificial debido a que lo que consideramos un individuo es por lo general solamente una pequeña porción de su ciclo vital. Cuando consideramos a un perro, por ejemplo, usualmente imaginamos a un adulto. Pero el perro es un "perro" a partir del momento de la fecundación de un gameto femenino de perro por un espermatozoide de perro. Sigue siendo un perro incluso como un sabueso moribundo senescente. Por lo tanto, el perro es en realidad el ciclo de vida total del animal, desde la fecundación hasta la muerte.

El ciclo de vida tiene que ser adaptado a su ambiente, que está compuesto de objetos no vivos así como de otros ciclos vitales. Consideremos, por ejemplo, el ciclo vital de *Clunio marinus*, una pequeña mosca que habita en las aguas de marea a lo largo de la costa oeste de Europa. Las hembras de esta especie viven solamente 2-3 horas como adultos, y deben aparearse y poner sus huevos dentro de este corto tiempo. Para hacer la cuestión aún más precaria, deben poner sus huevos sobre esteras de algas rojas que son expuestas solamente durante los mayores descensos de la marea de primavera. Estas mareas bajas se presentan durante cuatro días sucesivos poco después de las lunas llena y nueva (es decir, en intervalos aproximados de 15 días). Por lo tanto, el ciclo de vida de los insectos debe ser coordinado con el ciclo lunar así como con el ritmo de marea diario, de modo tal que los insectos salen de sus estuches pupales durante los pocos días de la marea de primavera y a la hora correcta para su descenso (Beck 1980; Neumann y Spindler 1991).

El círculo de la vida: las etapas del desarrollo animal

Uno de los principales triunfos de la embriología descriptiva fue la idea de un ciclo de vida generalizable. Cada animal, ya sea una lombriz de tierra, un águila, o un beagle, pasan por etapas semejantes de desarrollo. La vida de un nuevo individuo se inicia por la fusión del material genético a partir de dos gametos: el espermatozoide y el gameto femenino. Esta fusión, denominada **fecundación**, estimula al huevo (cigoto) a comenzar el desarrollo. Las etapas (fases o estadios) de desarrollo entre la fecundación y el nacimiento son colectivamente denominadas **embriogénesis**. A través del reino animal, existe una increíble variedad de tipos embrionarios, pero la mayoría de los patrones de embriogénesis es una variación sobre cinco tópicos principales:

1. Inmediatamente después de la fecundación se produce la **segmentación**. La segmentación es una serie de divisiones mitóticas extremadamente rápidas donde el inmenso volumen del citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células pequeñas. Estas células se denominan **blastómeras** y al final de la segmentación, forman una esfera conocida como **blástula**.

2. Después que el índice de división mitótica ha disminuido, las blastómeras experimentan movimientos drásticos en donde cambian sus posiciones una con respecto a la otra. Esta serie de extensas reorganizaciones celulares se denomina **gastrulación** y el embrión se dice que está en el estadio de **gástrula**. Como resultado de la gastrulación, el embrión contiene tres **capas germinales:** el ectodermo, el endodermo y el mesodermo.
3. Una vez establecidas las tres capas germinales, las células actúan recíprocamente entre ellas y se reorganizan para producir tejidos y órganos. Este proceso se denomina **organogénesis**. Muchos órganos contienen células de más de una capa germinal, y no es inusual que el exterior de un órgano sea derivado de una capa y el interior a partir de otra. Por ejemplo, la capa externa de la piel (epidermis) proviene del ectodermo, mientras que la capa interna (la dermis) proviene del mesodermo. También durante la organogénesis, algunas células experimentan extensas migraciones desde su origen hasta su localización definitiva. Estas células en migración incluyen a los precursores de las células sanguíneas, células linfáticas, células del pigmento y gametos. La mayoría de los huesos de nuestra cara deriva de células que han migrado ventralmente desde la región dorsal de la cabeza.
4. En muchas especies, una porción especializada del citoplasma del cigoto da origen a células que corresponden a los precursores de los **gametos** (espermatozoides y gametos femeninos). Los gametos y sus precursores celulares son colectivamente denominados **células germinales** y son apartados para la función reproductiva. Todas las otras células del cuerpo se denominan **células somáticas**. Esta separación en células somáticas (que dan origen al cuerpo del individuo) y en células germinales (que contribuyen a la formación de una nueva generación) es a menudo una de las primeras diferenciaciones que se producen durante el desarrollo animal. Las células germinales finalmente migran a las gónadas, donde se diferencian en gametos. El desarrollo de los gametos, denominado **gametogénesis**, generalmente no se completa hasta que el organismo ha llegado a ser físicamente maduro. En la madurez, los gametos pueden ser liberados y participar en la fecundación para comenzar un nuevo embrión. El organismo adulto finalmente experimenta un envejecimiento y muere.
5. En muchas especies, el organismo que nace del huevo (ovíparo) o que nace en el mundo (vivíparo) no es sexualmente maduro. De hecho, en la mayoría de los animales, el organismo joven es una **larva** que podría parecer significativamente diferente del adulto. Las larvas a menudo constituyen el estadio de vida que es utilizado para alimentarse o dispersarse. En muchas especies, el estado larval es uno de los que dura más tiempo, y el adulto es un estado breve exclusivamente para la reproducción. En las polillas del gusano de seda, por ejemplo, los adultos no tienen partes de la boca y no pueden alimentarse. La larva debe comer lo suficiente para que el adulto pueda sobrevivir y aparearse. De hecho, la mayoría de las hembras de polilla se aparea tan rápido como eclosiona de su pupa, y vuela solo una vez para poner sus huevos. Luego mueren.

El ciclo de vida de la rana

La figura 2-1 utiliza el desarrollo de la rana leopardo, *Rana pipiens*, para mostrar un ciclo vital representativo. Miremos este ciclo vital con un poco más de detalle.

En la mayoría de las ranas, la gametogénesis y la fecundación son acontecimientos estacionales debido a que su vida depende de plantas e insectos de las lagunas en donde éstas viven y de la temperatura del aire y del agua. Una combinación de fotoperíodos (horas de luz del día) y temperatura le dicen a la glándula hipófisis de la rana hembra que es primavera. Si la hembra está madura, su glándula hipófisis secreta hormonas que estimulan al ovario a producir estrógenos. El estrógeno es una hormona que puede instruir al hígado a producir y secretar proteínas vitelinas tales como vitelogenina, que son luego transportadas a través de la sangre hacia los huevos* en crecimiento del ovario.† El vitelo es transportado hacia la porción inferior del huevo (fig. 2-2A). La mitad inferior del huevo generalmente contiene más vitelo que la mitad superior y es denominada el **hemisferio vegetal** del huevo. Por el contrario, la mitad superior del huevo tiene en general menos vitelo y es denominada el hemisferio animal del huevo.‡

Otra hormona del ovario, la progesterona, le indica al ovocito la reanudación de su división meiótica. Esto es necesario debido a que el gameto femenino ha sido "congelado" en la metafase de su primera meiosis. Cuando éste ha completado su primera división meiótica, el ovocito es liberado del ovario y puede fecundarse. En muchas especies, el ovocito está incluido en una cubierta de gelatina que actúa aumentando su tamaño (de modo que no será tan fácilmente comido), para protegerlo contra las bacterias, y para atraer y activar al espermatozoide.

La producción de espermatozoides también tiene lugar sobre bases estacionales. Las ranas macho leopardo producen sus espermatozoides en verano, y por el tiempo en el que comienzan la hibernación en otoño,

---

* Como veremos en capítulos posteriores, hay numerosos caminos por el que puede inducirse la síntesis de una proteína. Los estrógenos estimulan la producción de proteína vitelogenina mediante dos vías. En primer lugar, éstos utilizan la regulación transcripcional para hacer nuevo mRNA de vitelogenina. Antes de la estimulación de estrógenos, no puede ser visto ningún mensajero de vitelogenina en las células hepáticas. Luego de la estimulación, hay cerca de 50.000 moléculas de mRNA de vitelogenina en estas células. Los estrógenos también pueden regular la traducción para estabilizar estos mensajeros específicos, incrementando su vida media de 16 horas a 3 semanas. En este sentido, más proteína puede ser traducida a partir de cada mensajero.

† Los términos *animal* y *vegetal* reflejan los movimientos de las células observados en algunos embriones (como los de rana). Las células derivadas a partir de la porción superior del huevo se dividen más rápidamente y están activamente móviles (por lo tanto, animadas), mientras que las células rellenas de vitelo de la mitad vegetal fueron observadas como siendo inmóviles (por lo tanto, como plantas).

‡ *Nota del traductor:* el concepto de huevo aplicado en esta sección se refiere a un gameto sin fecundar, pero sin distinguir en qué estado se encuentra. Al ser fecundado pasará a denominarse célula huevo (o cigoto) y posteriormente la estructura en desarrollo adoptará la denominación que caracterice a cada estadio de desarrollo (p. ej., mórula, blástula).

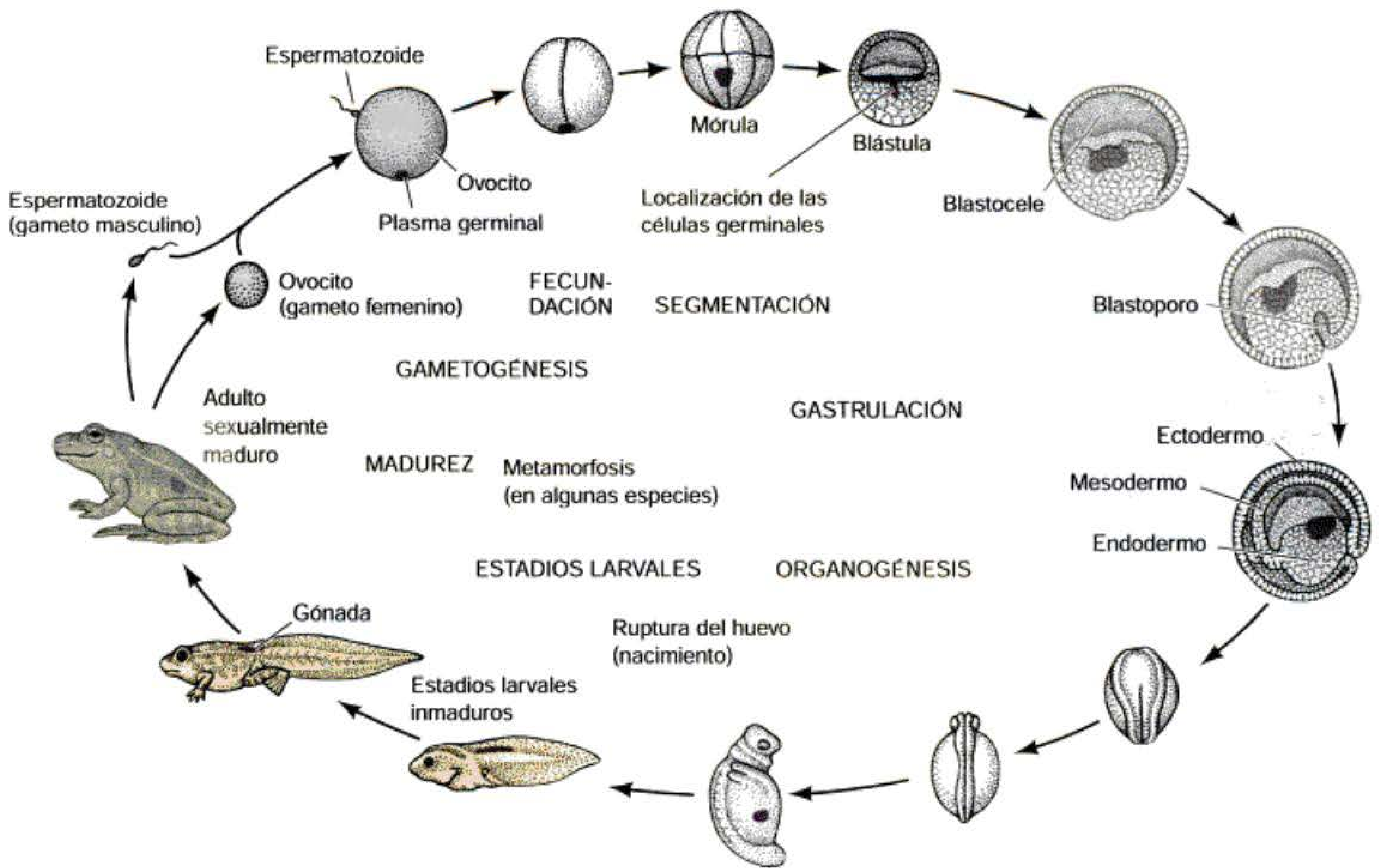


Fig. 2-1. Historia de desarrollo de la rana leopardo, *Rana pipiens*. Los estadios desde la fecundación hasta la ruptura del huevo (nacimiento) son conocidos colectivamente como embriogénesis. La región apartada para producir células germinales se muestra en púrpura brillante. La gametogénesis que es completada en los adultos sexualmente maduros, comienza a diferentes tiempos durante el desarrollo, dependiendo de la especie. (Los tamaños de las cuñas de colores variados que se muestran aquí son arbitrarios y no se corresponden con las proporciones de la duración de los ciclos de vida en cada estado.)

han producido todos los espermatozoides que son viables para la siguiente estación reproductiva de primavera. En la mayoría de las especies de rana, la fecundación es externa. La rana macho agarra a la hembra por el dorso y fecunda los huevos cuando la hembra los libera (fig. 2-2B). La *Rana pipiens* generalmente deposita cerca de 2.500 huevos, mientras que la rana toro, *Rana catesbiana*, puede poner tantos como 20.000. Algunas especies ponen sus huevos en la vegetación de las lagunas, y su gelatina se adhiere a las plantas en las que ancla los huevos (fig. 2-2C). Otras especies ponen a flotar sus huevos en el centro de la laguna sin soporte alguno.

La fecundación consigue varias cosas. En primer lugar, permite que el ovocito complete su segunda división meiótica, que proporciona al ovocito un **pronúcleo** haploide. Los pronúcleos del ovocito y del espermatozoide se encuentran en el citoplasma del ovocito para formar el núcleo cigoto diploide. En segundo lugar, la fecundación provoca que el citoplasma del huevo se mueva tanto que las diferentes partes de citoplasma se encuentran en nuevas localizaciones (fig. 2-2D). En tercer lugar, la fecundación las moléculas necesarias para comenzar la segmentación celular y el desarrollo (Rugh 1950). El espermatozoide y el ovocito mueren rápidamente si no se produce la fecundación.

Durante la segmentación, el volumen de la célula huevo de rana se mantiene constante, pero éste se divide en decenas de miles de células (fig. 2-2E-H). El hemisferio animal de la célula huevo se divide más rápido que el hemisferio vegetal y las células del hemisferio vegetal llegan a ser progresivamente más grandes en el hemisferio vegetal del citoplasma. Una cavidad llena de fluido, el **blastocele**, se forma en el hemisferio animal (fig. 2-2I). Esta cavidad será importante para permitir que se produzcan los movimientos celulares durante la gastrulación.

La gastrulación en las ranas comienza con la formación de una fosa en un punto sobre la superficie del embrión aproximadamente a unos 180° opuesta al sitio de ingreso del espermatozoide, que se denomina el **blastoporo**. Al principio, solo se hace una pequeña muesca. Las células que migran a través de este **labio dorsal del blastoporo** migran hacia el polo animal (fig. 2-3A, B). Estas células se convierten en el mesodermo dorsal. El blastoporo se expande en un círculo (fig. 2-3C), y las células migran a través de los labios lateral y ventral de este círculo llegando a ser el mesodermo lateral y ventral. Las células que se mantienen sobre la superficie exterior se convierten en ectodermo, y esta capa externa se expande vegetalmente para incluir al embrión en su totalidad. Las grandes células de vitelo que se mantienen en el hemisferio vegetal (hasta que son rodeadas por el ectodermo) se convierten en el endodermo. De este modo, al final de la gastrulación, el ectodermo (el precursor de la

A

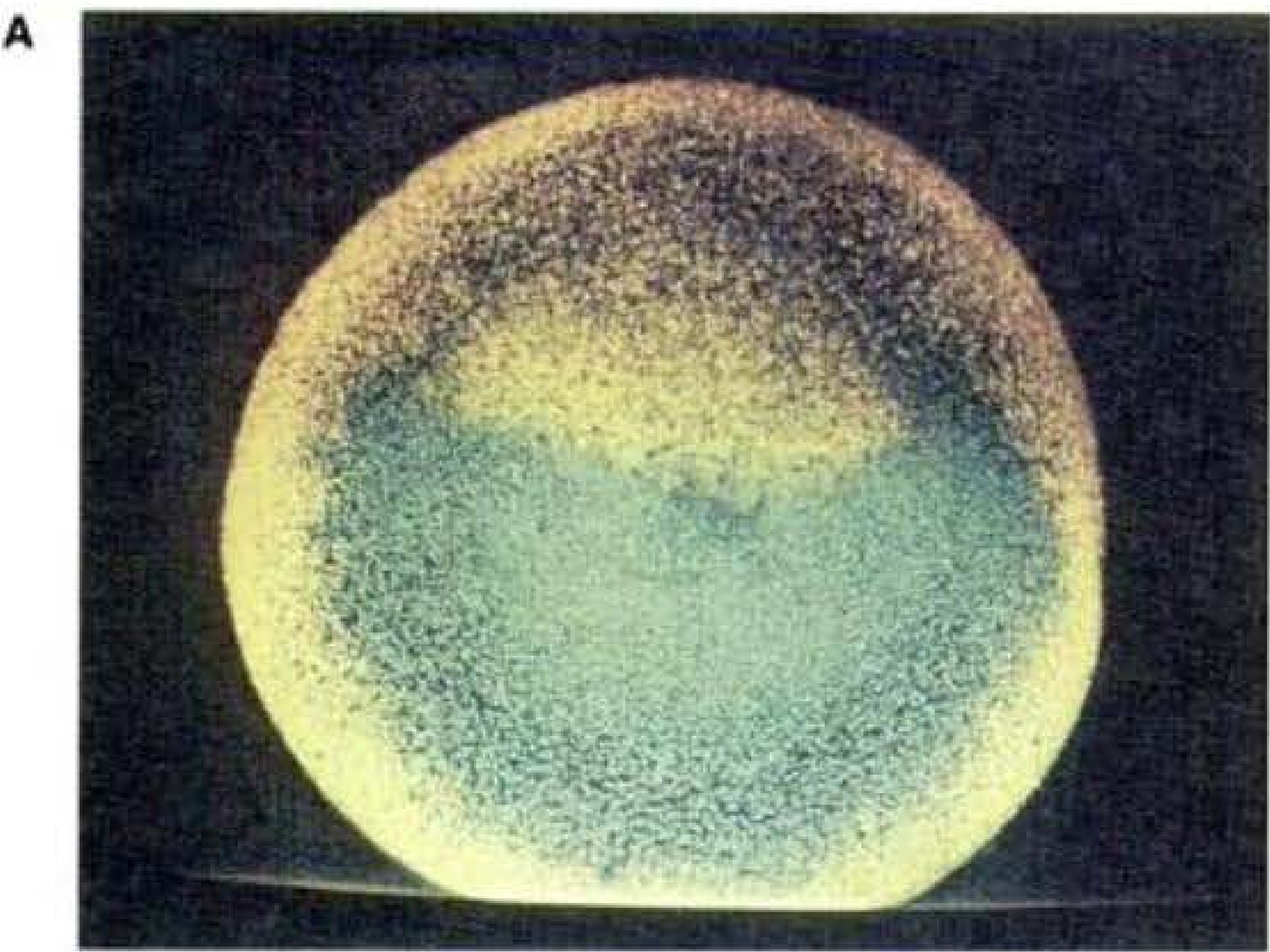
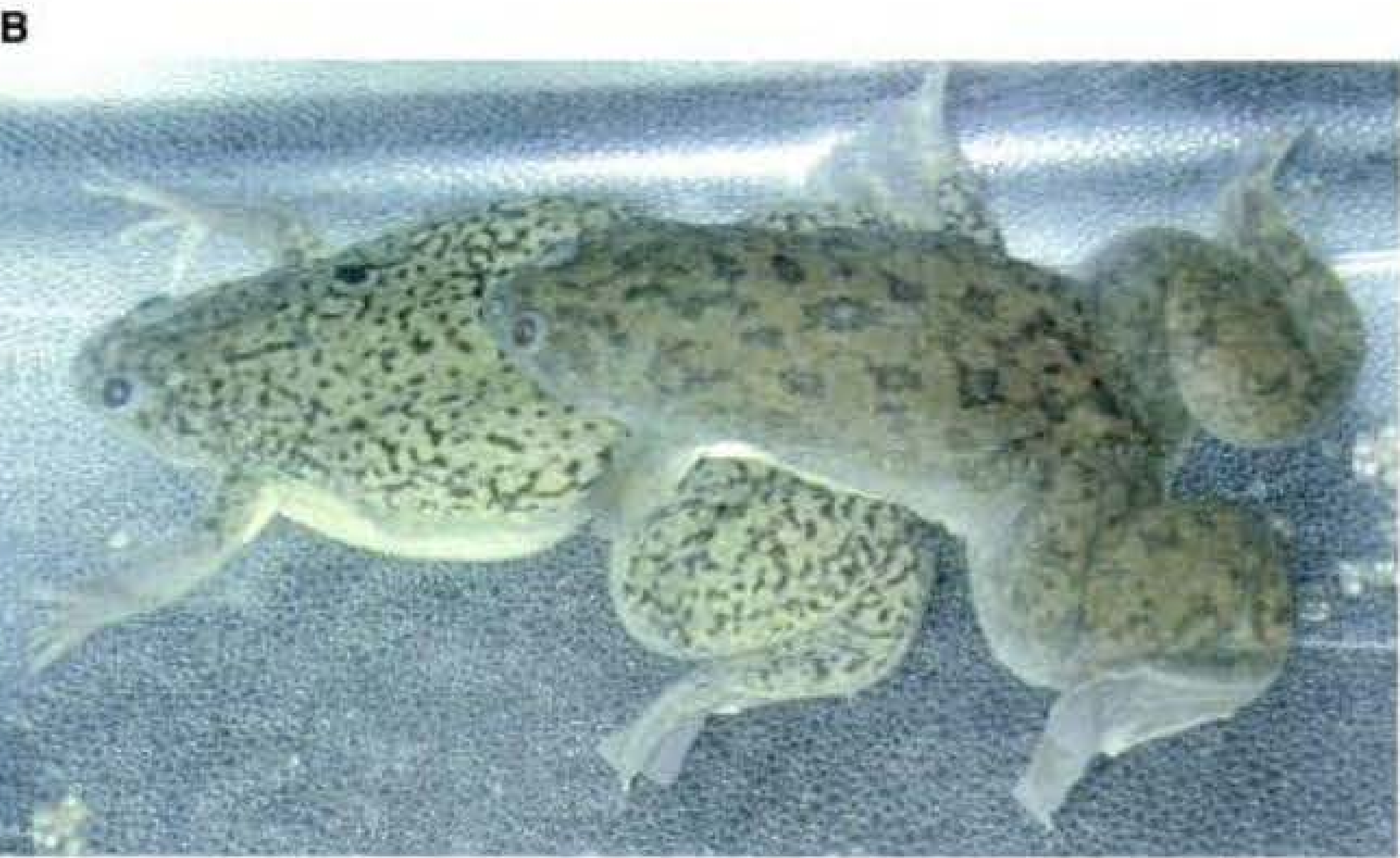


Fig. 2-2. Desarrollo temprano de la rana *Xenopus laevis*. **A.** Cuando el huevo madura, éste acumula vitelo (aquí coloreado de amarillo y verde) en el citoplasma vegetal. **B.** Las ranas se aparean por amplexus, el macho agarra a la hembra alrededor del abdomen y fecunda los huevos cuando son liberados. **C.** Un nido recién puesto de huevos. El área marrón de cada huevo es el capuchón animal pigmentado. La mancha blanca en el medio del pigmento es donde reside el núcleo del huevo. **D.** Reorganización del citoplasma observada durante la primera división de segmentación. Compárese con el estado inicial observado en A. **E.** Un embrión de 2 células cerca del final de la primera segmentación. **F.** Un embrión de 8 células. **G.** Blástula temprana. Obsérvese que las células se vuelven más pequeñas, pero el volumen del huevo se mantiene constante. **H.** Blástula tardía. **I.** Sección transversal de una blástula tardía que muestra el blastocele (cavidad). (A-H, cortesía de Michael Danilchik y Kimberly Ray; I, cortesía de J. Heasman.)

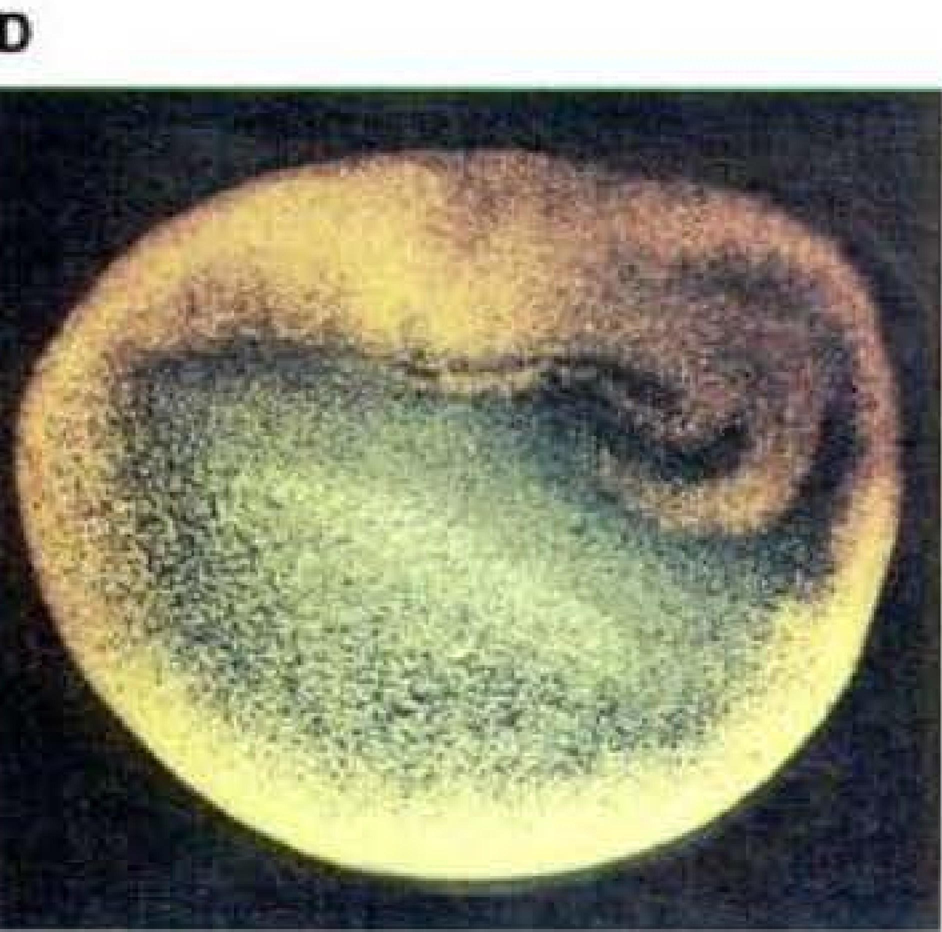
B



C



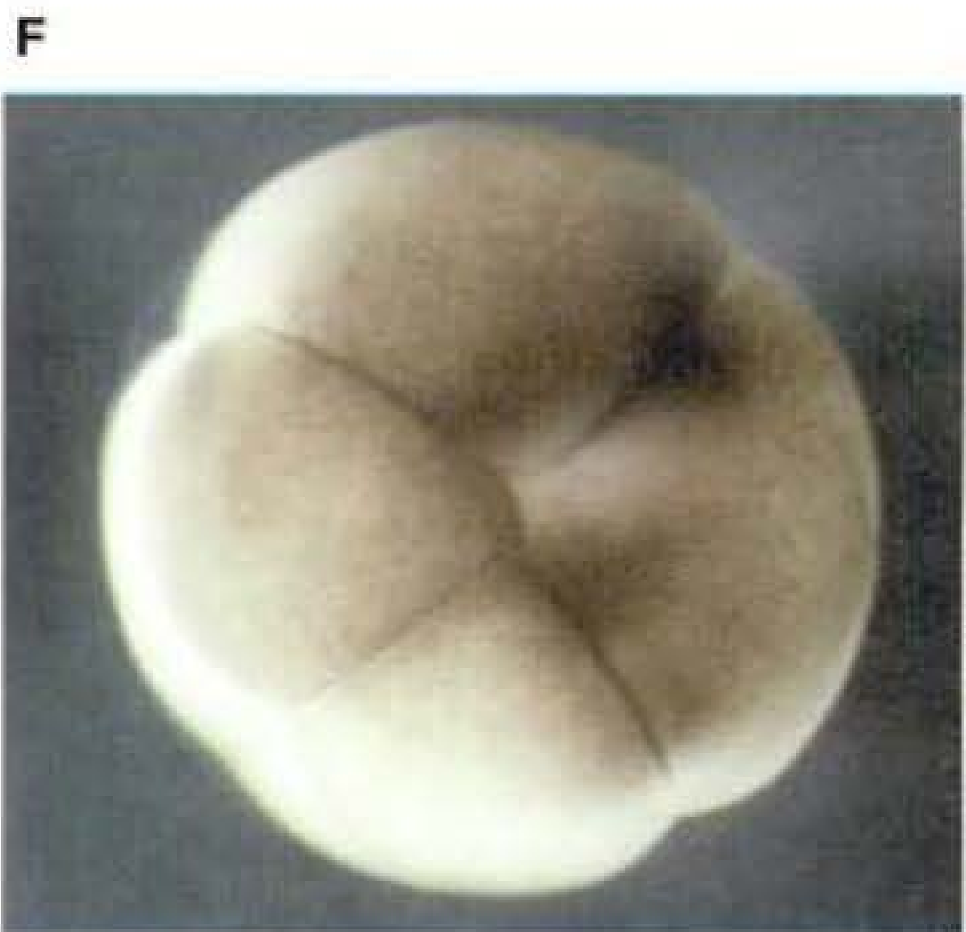
D



E



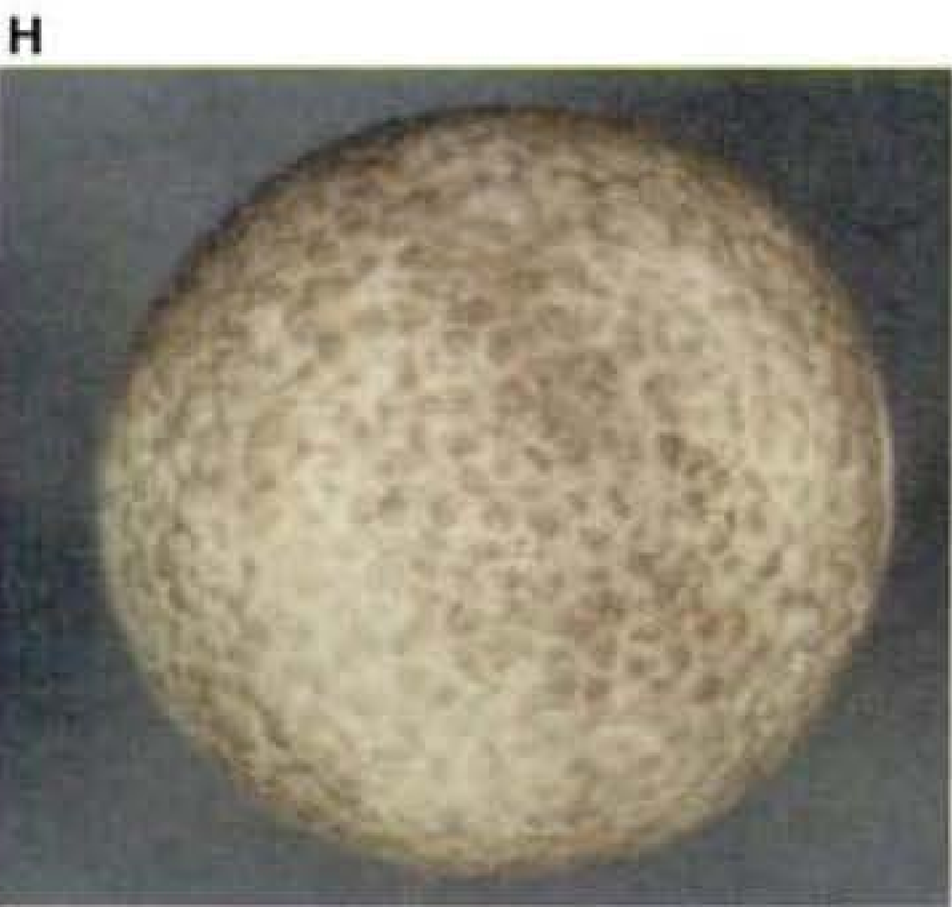
F



G



H



I

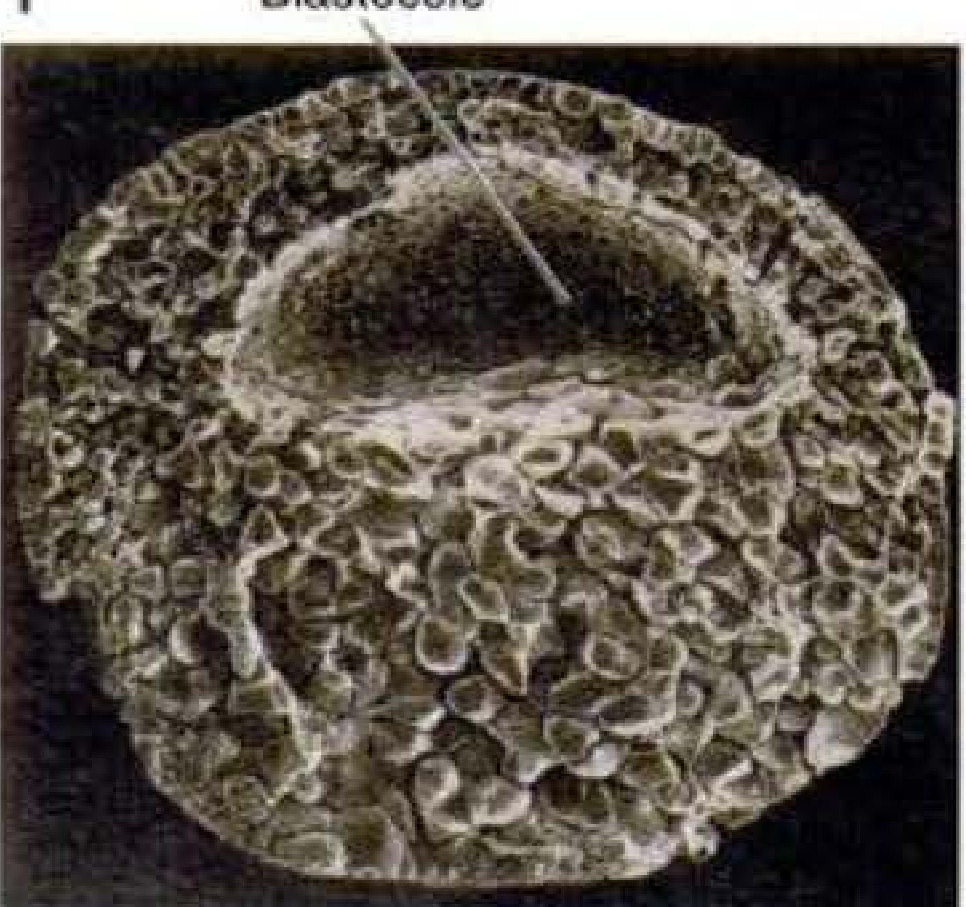
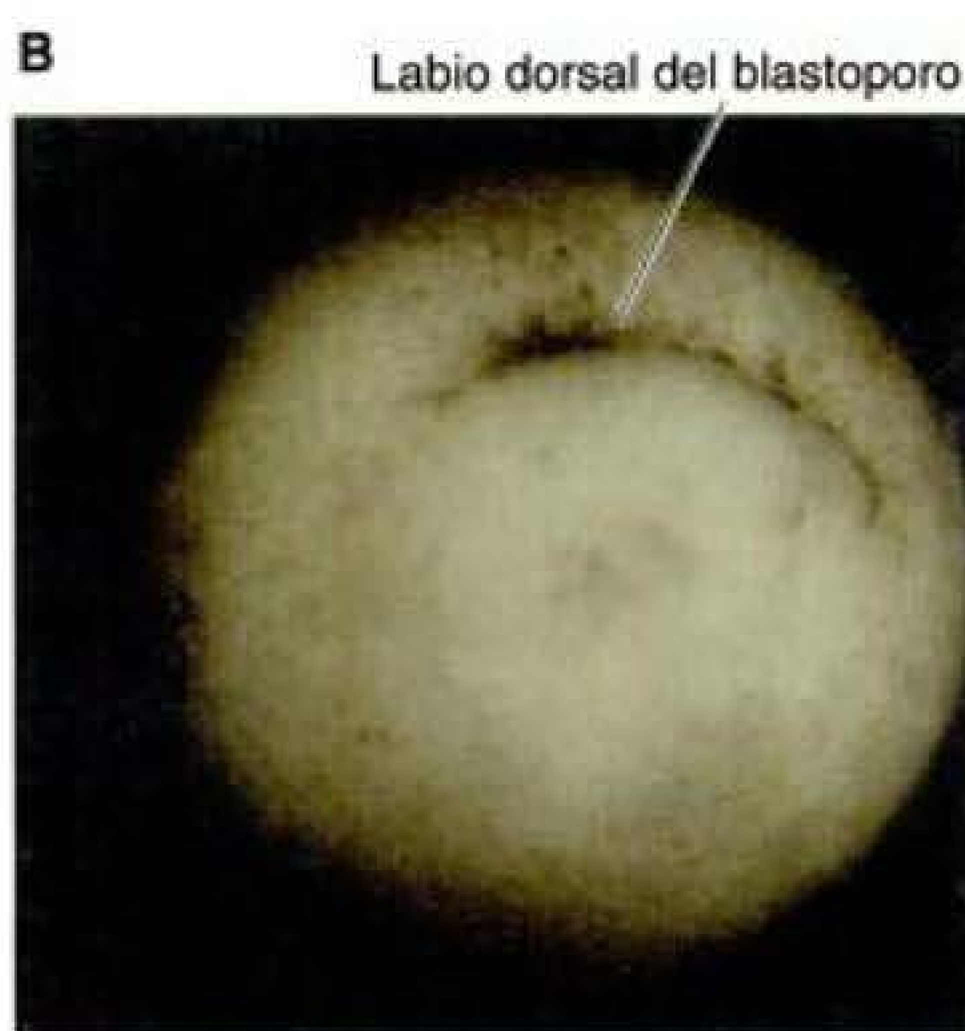


Fig. 2-3. Desarrollo continuado de *Xenopus laevis*. **A.** La gastrulación comienza con una invaginación, o hendidura, en el futuro lado dorsal (arriba) del embrión. **B.** Esta hendidura, el labio dorsal del blastoporo, como se observa desde la superficie ventral (abajo) del embrión. **C.** La hendidura se convierte en un círculo, el blastoporo. Las futuras células mesodérmicas migran hacia el interior del embrión a lo largo de los bordes del blastoporo, y el ectodermo (futura epidermis y tejido nervioso) migra hacia abajo en el exterior del embrión. La parte que queda, el endodermo relleno de vitelo, es finalmente cercada. **D.** Los pliegues neurales comienzan a formarse sobre la superficie dorsal. **E.** Se puede ver un surco donde estará la superficie basal del tubo neural. **F.** Los pliegues neurales se acercan a la línea media dorsal, formando un tubo neural. **G.** Sección transversal del embrión de *Xenopus* en el estadio de néurula. **H.** Renacuajo antes de nacer, cuando las prominencias del cerebro anterior comienzan a inducir la formación de los ojos. **I.** Renacuajo maduro, que tiene que nadar lejos de la masa del huevo y alimentarse independientemente. (Fotografías cortesía de Michael Danilchik y Kimberly Ray.)

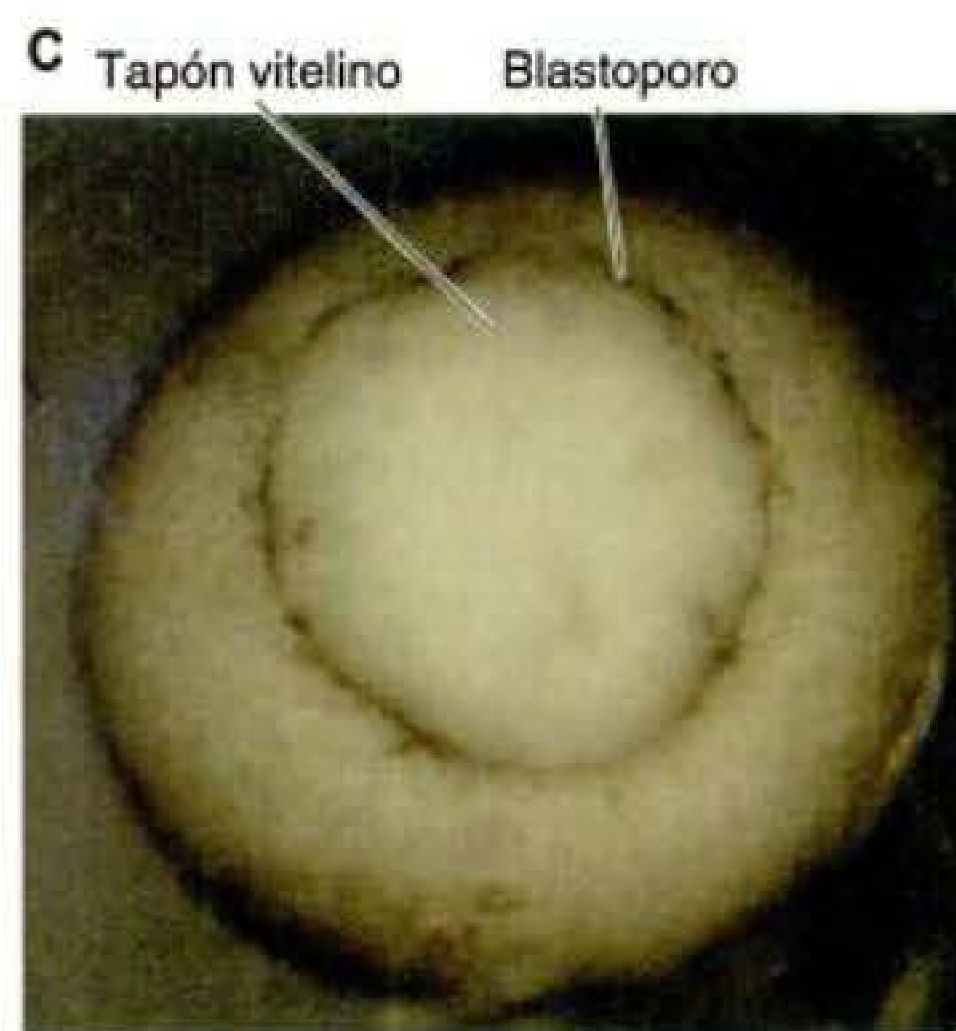
A



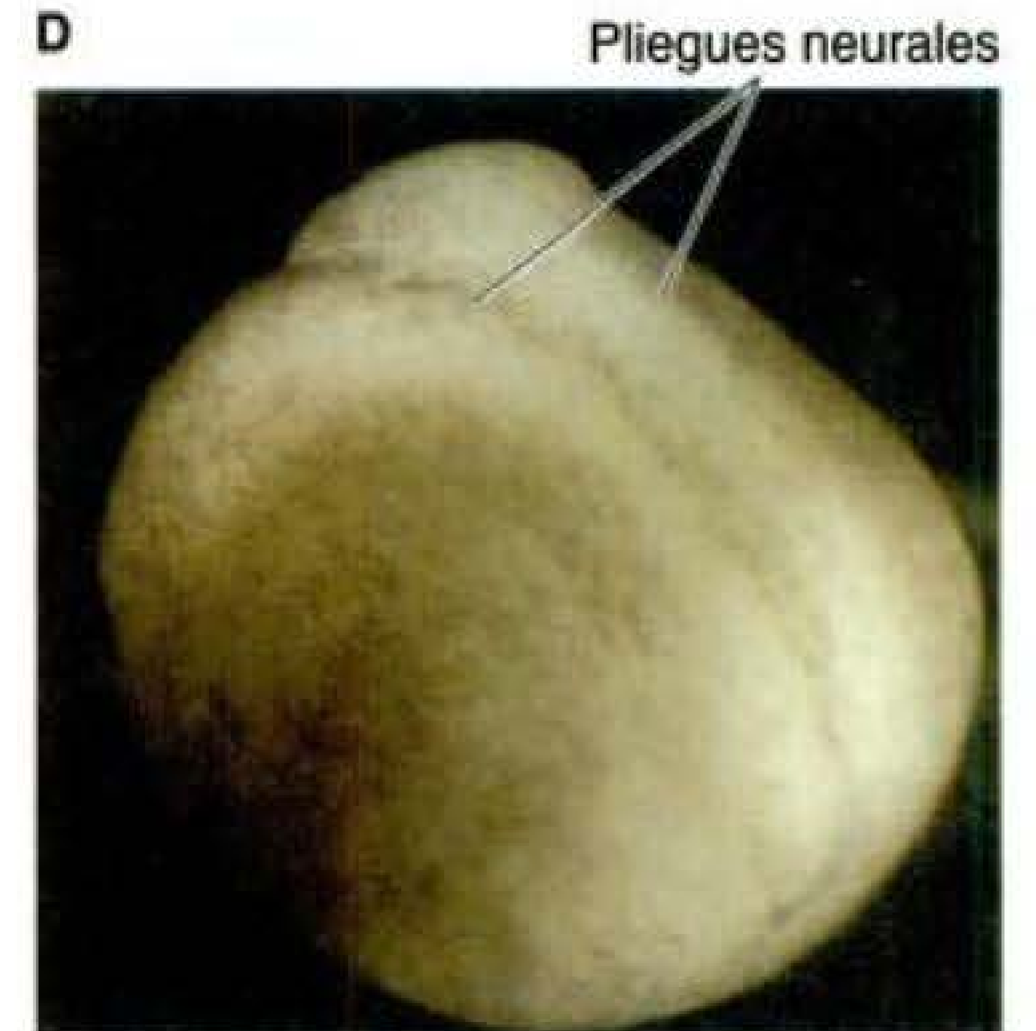
B



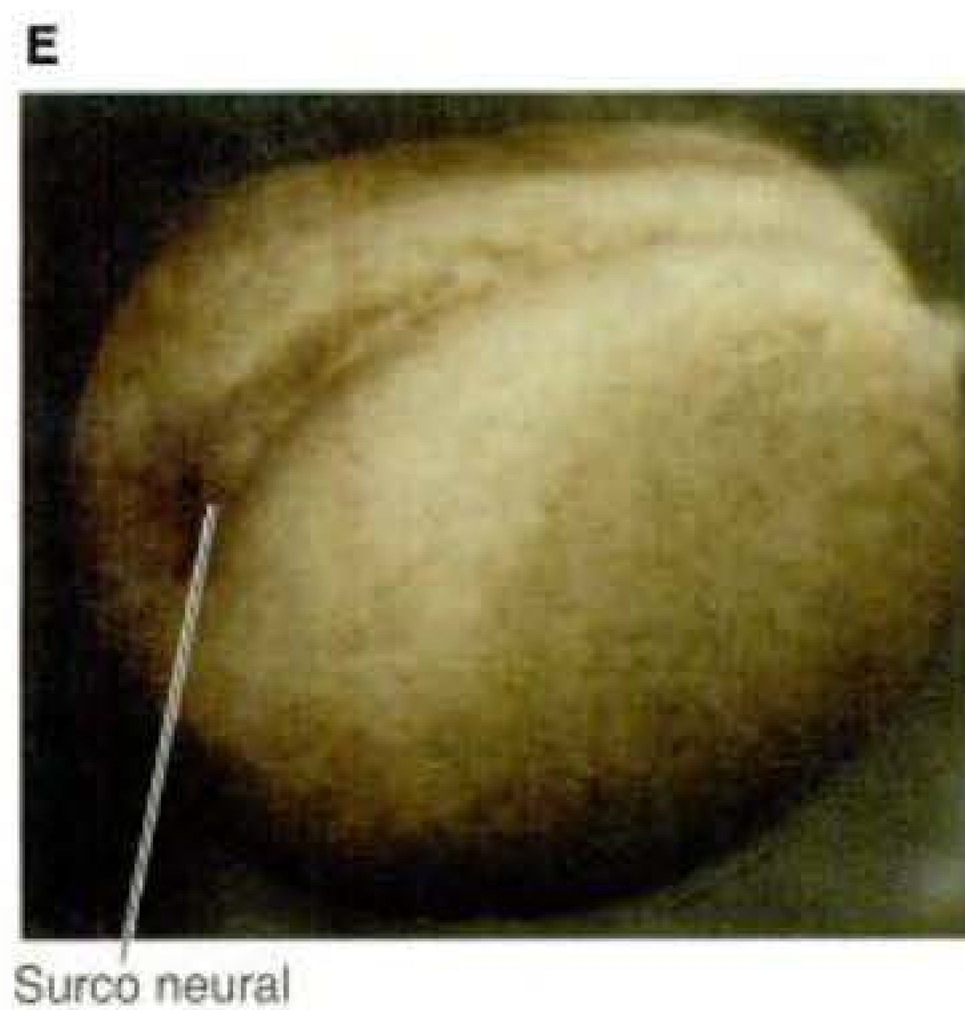
C



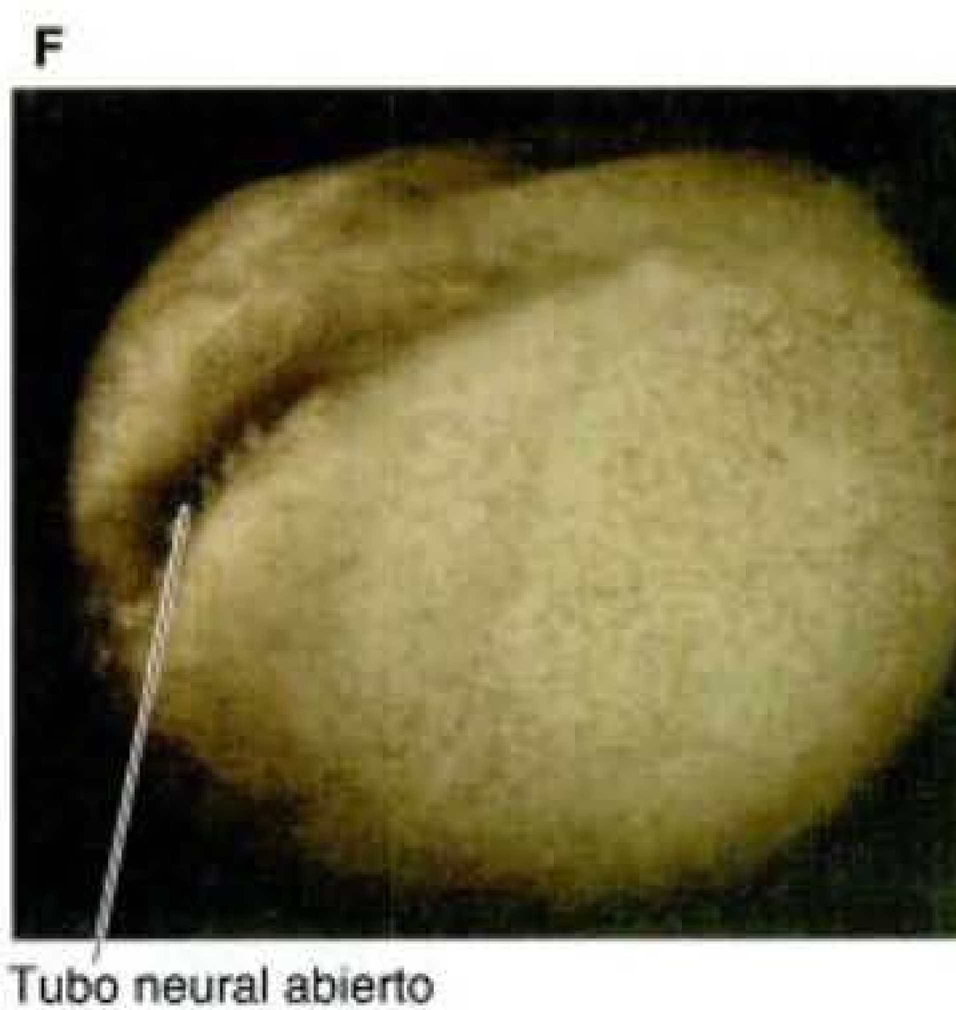
D



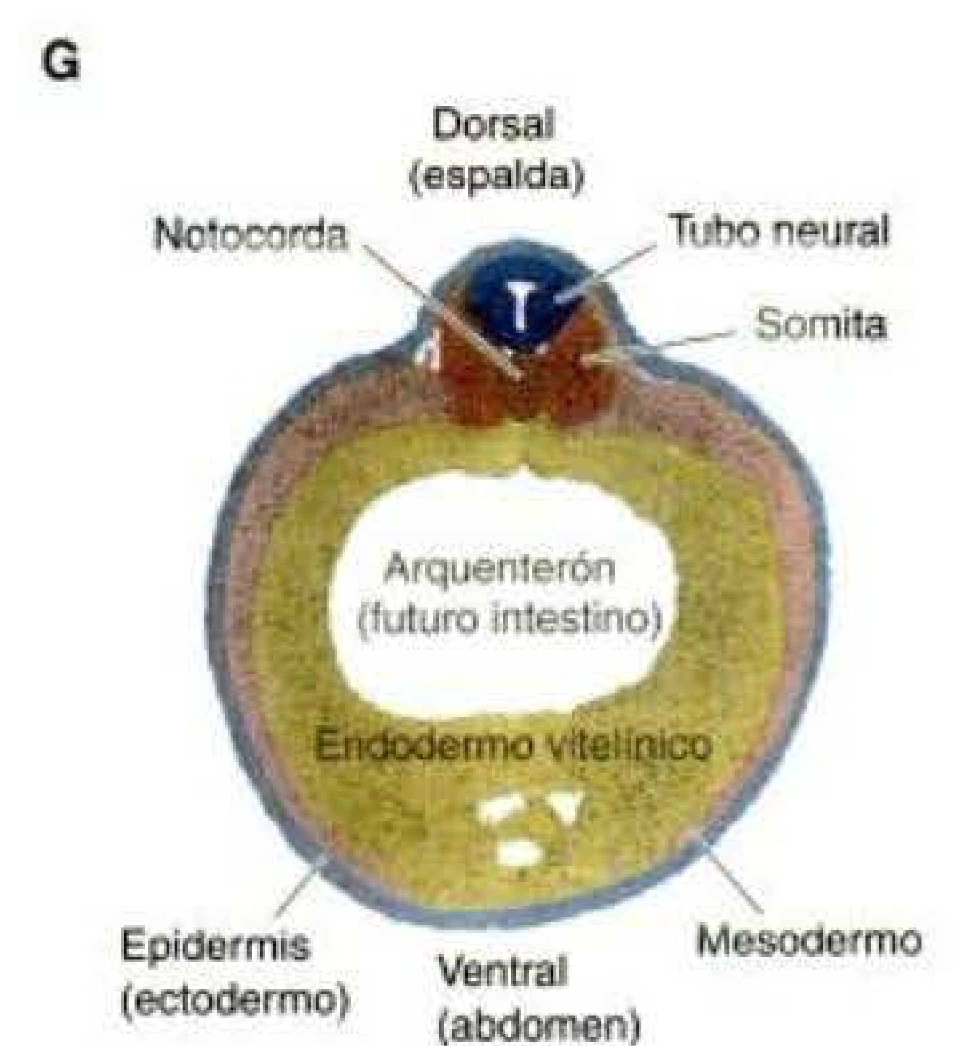
E



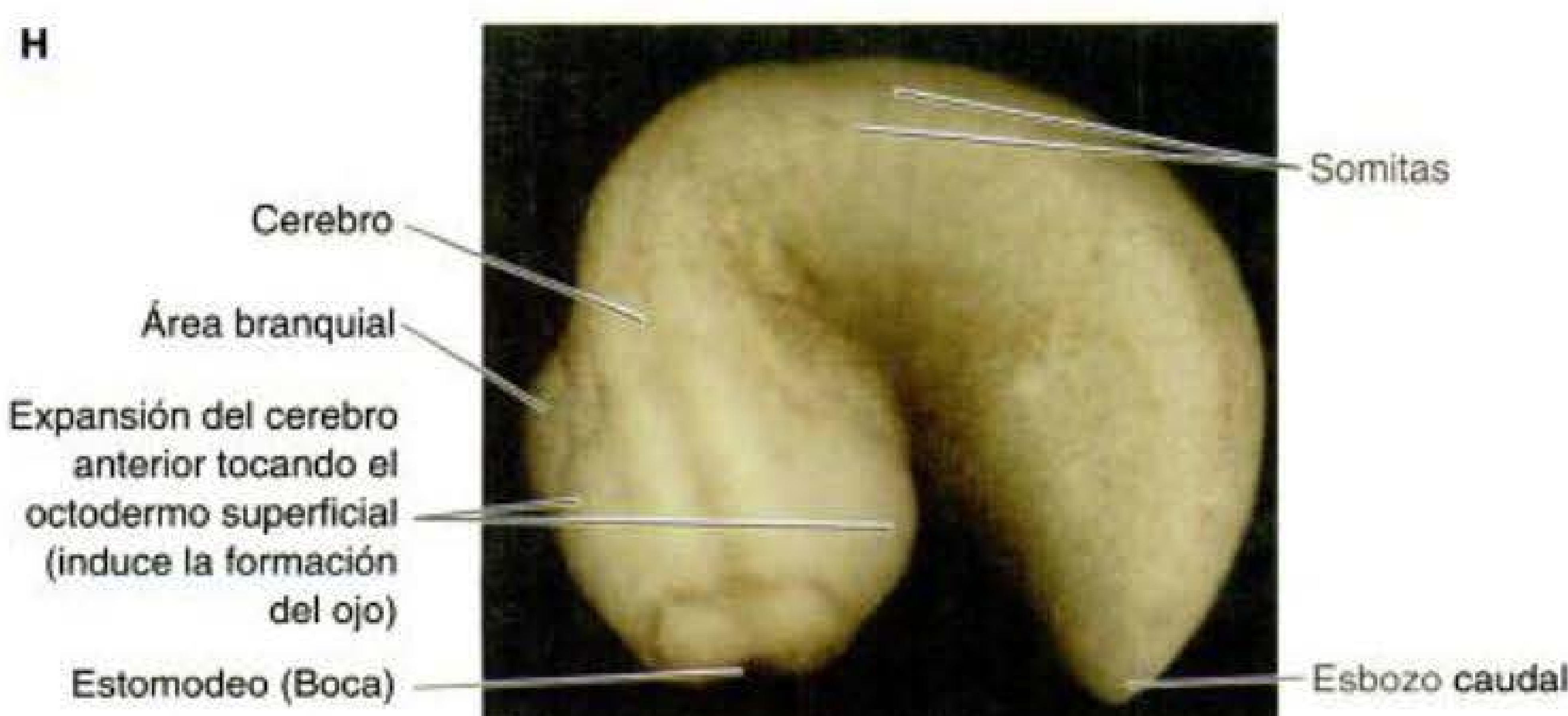
F



G



H



I



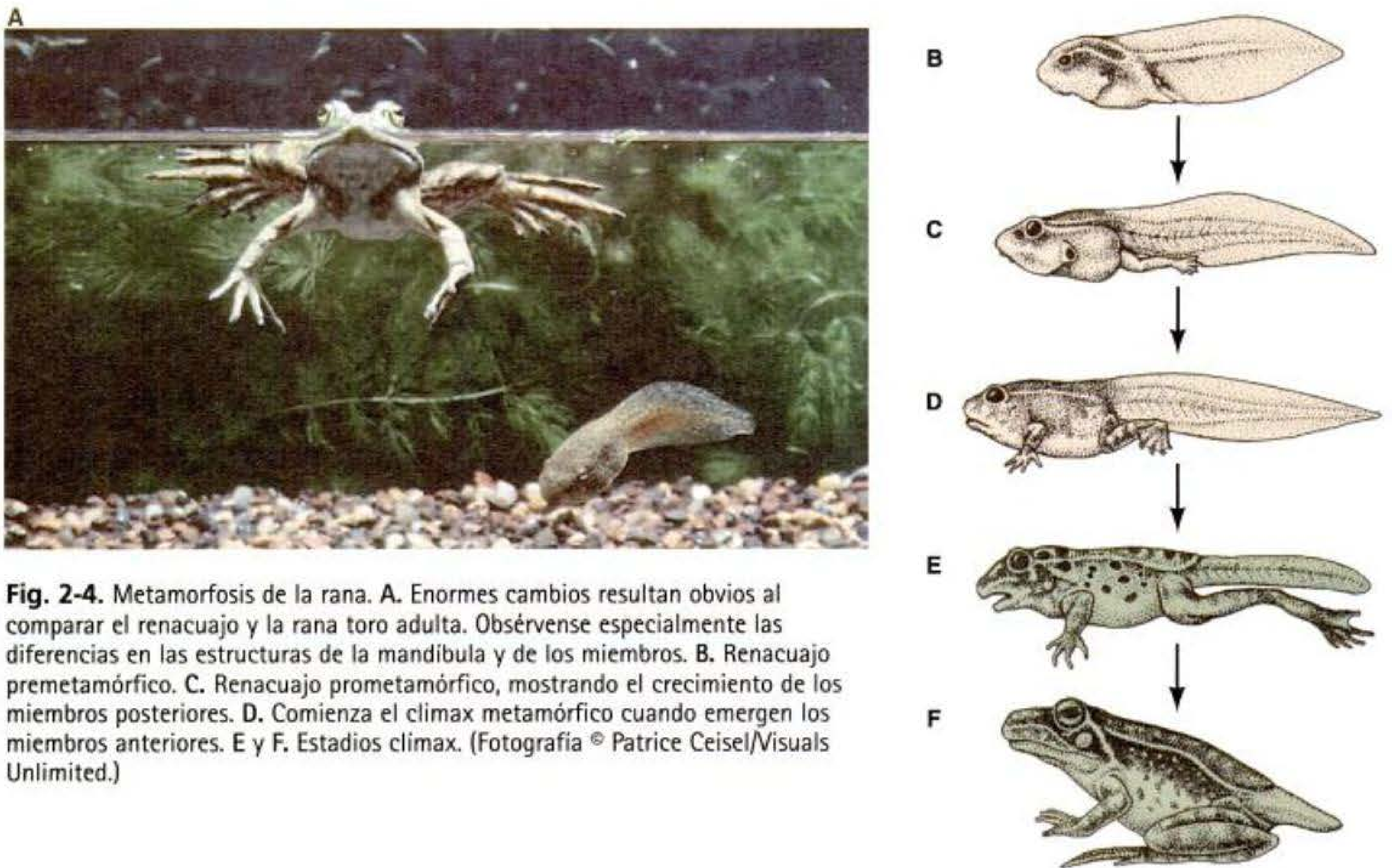


Fig. 2-4. Metamorfosis de la rana. **A.** Enormes cambios resultan obvios al comparar el renacuajo y la rana toro adulta. Obsérvense especialmente las diferencias en las estructuras de la mandíbula y de los miembros. **B.** Renacuajo premetamórfico. **C.** Renacuajo prometamórfico, mostrando el crecimiento de los miembros posteriores. **D.** Comienza el climax metamórfico cuando emergen los miembros anteriores. **E** y **F.** Estadios climax. (Fotografía © Patrice Ceisel/Visuals Unlimited.)

epidermis y del tejido nervioso) está sobre el exterior del embrión, el endodermo (el precursor del revestimiento intestinal) se encuentra sobre el interior del embrión, y el mesodermo (el precursor del tejido conectivo, sangre, esqueleto, gónadas y riñones) se encuentra entre ellos.

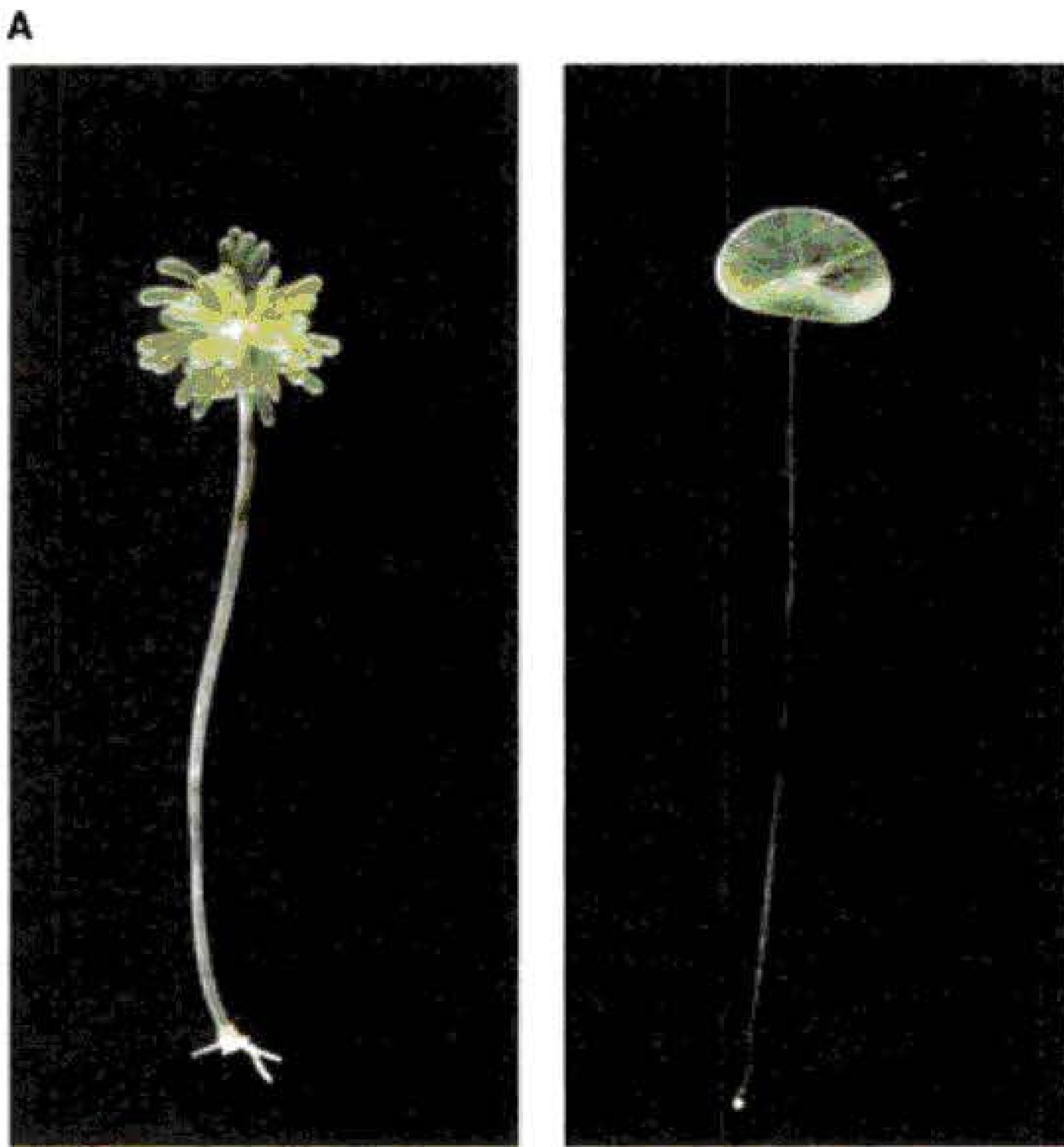
La organogénesis comienza cuando la notocorda –un cordón de células mesodérmicas en la porción más dorsal del embrión– indica a las células ectodérmicas que están por arriba que éstas no llegarán a ser epidermis. En su lugar, estas células del ectodermo dorsal forman un tubo que llega a ser el sistema nervioso. En este estadio, el embrión se denomina **néurula**. Los precursores de las células neurales se elongan, estiran y pliegan en el embrión (fig. 2-3D-F) y forman el **tubo neural**. Estas células son cubiertas por las futuras células epidérmicas del dorso. Las células que han conectado el tubo neural a la epidermis se convierten en las **células de la cresta neural**; éstas son casi como una cuarta capa germinal, ya que dan origen a las células de pigmento del cuerpo (los melanocitos), a neuronas periféricas y al cartílago de la cara.

Una vez que se ha formado el tubo neural, éste induce cambios en sus vecinos y la organogénesis continúa. El tejido mesodérmico adyacente a la notocorda se vuelve segmentado en **somitas**, los precursores de los músculos del dorso de la rana, de las vertebras espinales y de la dermis (la porción interna de la piel). Estos somitas aparecen como bloques de tejido mesodérmico (fig. 2-3F, G). El embrión desarrolla una boca y un ano y se alarga en una estructura típica de renacuajo (fig. 2-3H). Las neuronas hacen sus conexiones con los músculos y con otras neuronas, se forman las branquias y la larva está lista para eclosionar de su huevo de gelatina. El eclosionado nacido se alimenta rápidamente por sí mismo una vez que el suplemento de vitelo dado por su madre se agota (fig. 2-3I).

La metamorfosis de la larva del renacuajo a una rana adulta es una de las transformaciones más sorprendentes en toda la biología (fig. 2-4). Estos cambios preparan a un organismo acuático para la existencia terrestre. En anfibios, la metamorfosis se inicia por hormonas de la glándula tiroides del renacuajo. (El mecanismo por el que las hormonas tiroideas llevan a cabo este cambio se discutirá en el cap. 18). En los anuros (ranas y renacuajos), casi cada órgano está sujeto a modificaciones y los cambios que resultan en la forma son asombrosos y muy obvios. Se diferencian los miembros posteriores y los miembros anteriores que el adulto utilizará para la locomoción y se reabsorbe la cola de pala del renacuajo. El cráneo cartilaginoso del renacuajo es reemplazado por el cráneo predominantemente óseo de las ranas jóvenes. Los dientes córneos del renacuajo que utilizan para arrancar plantas en las lagunas desaparecen cuando la boca y las mandíbulas adquieren una nueva forma, y se desarrolla el músculo de la lengua de la rana para cazar moscas. Mientras tanto, el largo intestino característico de los herbívoros se acorta para adaptarse a la dieta más carnívora de la rana adulta. Las branquias experimentan regresión y los pulmones se agrandan. Cuando termina la metamorfosis, comienza el desarrollo de las primeras células germinales. En la *Rana pipiens*, el desarrollo del huevo dura 3 años. En ese momento, la rana hembra es sexualmente madura y puede producir recién nacidos de ella misma.

La velocidad de la metamorfosis se adapta cuidadosamente a las presiones ambientales. En regiones templadas, por ejemplo, la metamorfosis de la *Rana* se debe producir antes de que las lagunas se congelen en invierno. Una rana leopardo adulta puede cavar dentro del barro y sobrevivir al invierno; el renacuajo no lo puede hacer.

A



B

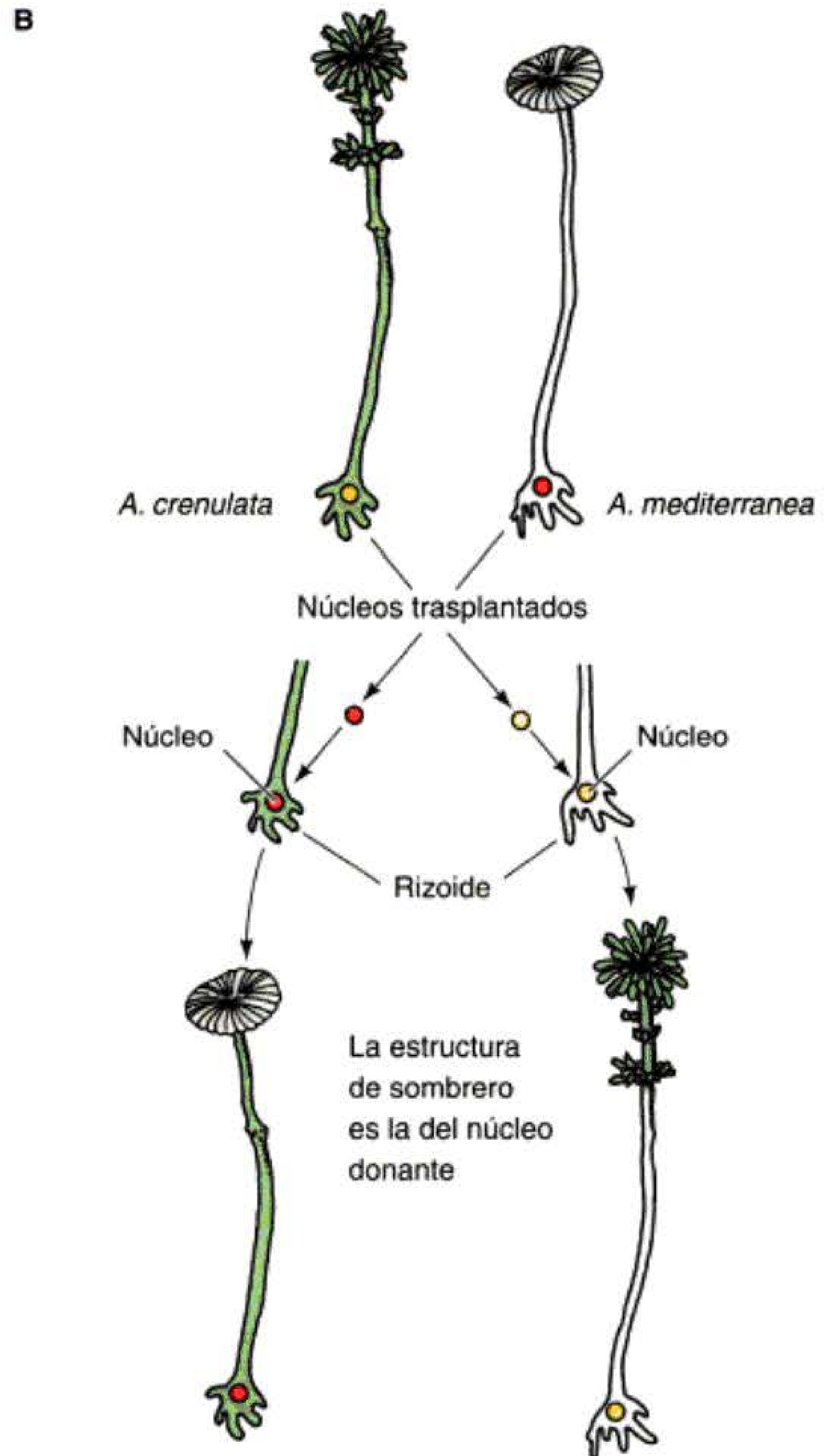


Fig. 2-5. A. *Acetabularia crenulata* (izquierda) y *A. mediterranea* (derecha). Cada individuo es una única célula. El rizoide contiene el núcleo. **B.** Efectos del intercambio de núcleos entre dos especies de *Acetabularia*. Los núcleos fueron trasplantados en fragmentos de rizoides enucleados. Las estructuras de *A. crenulata* son más oscuras, las estructuras de *A. mediterranea* de un verde más claro. (Fotografías cortesia de S. Berger.)

SITIO WEB 2-1 **Animales inmortales (Inmortal animals).** Imagine a un animal multicelular que adquiere inmortalidad al retornar a su forma larval en vez de envejecer. Parece ser que esto es lo que hace la hidra marina *Turritopsis*.

SITIO WEB 2-2 **El ciclo vital humano (The human life cycle).** El animal humano proporciona un ciclo de vida fascinante para estudiar. Aquí están algunos de los sitios web que especulan acerca de (A) ¿Cuándo es un embrión o feto "humano"? B) ¿De qué manera el modo extraño mediante el cual se desarrolla el cerebro hace de la niñez una necesidad? y C) ¿Los seres humanos experimentan metamorfosis?

VADE MECUM[2] **El ciclo vital del anfibio (The amphibian life cycle).** El ciclo vital de una rana se ilustra en fotografías marcadas y en videomicroscopia de tiempo.
[Hacer clic sobre Amphibian]

La evolución de los patrones de desarrollo en los protistas unicelulares

Cada uno de los organismos vivos se desarrolla. El desarrollo puede ser visto entre los organismos unicelulares. Además, mediante el estudio del desarrollo de los protistas unicelulares, podemos ver las formas más simples de diferenciación y de reproducción sexual.

Control de la morfogénesis del desarrollo: la función del núcleo

Un siglo atrás, todavía no se había demostrado que el núcleo de la célula contenía información hereditaria o de desarrollo. Algunas de las mejores evidencias para esta teoría provinieron de estudios en los que los organismos unicelulares fueron fragmentados en trozos con núcleo y sin núcleo (revisión de Wilson 1896). Cuando varios protistas fueron cortados en fragmentos, casi todos los trozos murieron. Sin embargo, los fragmentos que contenían núcleos pudieron vivir y regenerar estructuras celulares complejas enteras.

El control nuclear de la morfogénesis celular y las interacciones del núcleo y del citoplasma están excelentemente demostrados en los estudios del protista

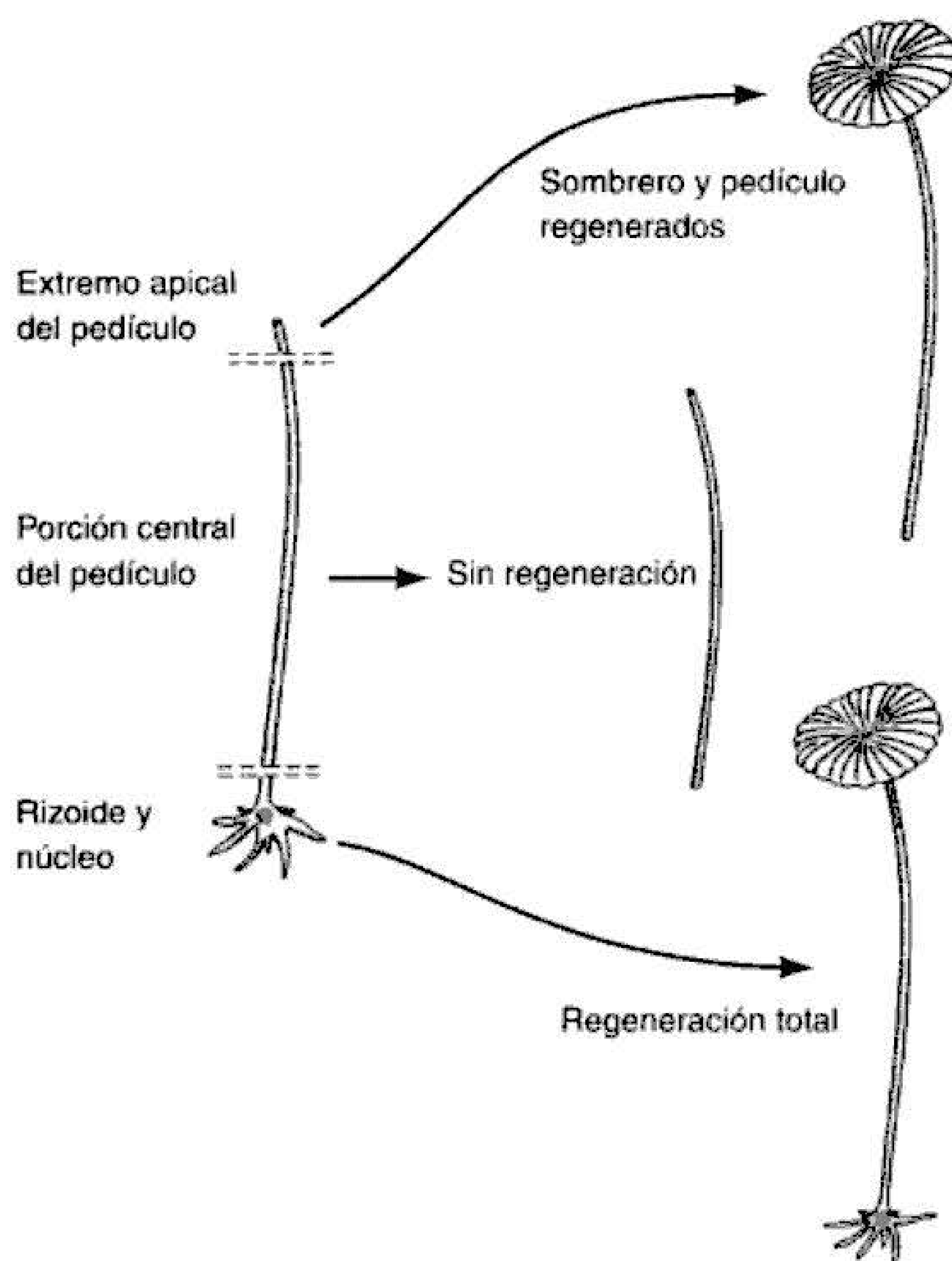


Fig. 2-6. Capacidad regenerativa de diferentes fragmentos de *A. mediterranea*.

Acetabularia. Esta única célula gigante (2-4 cm de longitud) consiste en tres partes: un sombrero, un pedículo y un rizoide (o "pie") (fig. 2-5A; Mandoli 1998). El rizoide está localizado en la base de la célula y lo sostiene al sustrato. El único núcleo de la célula se localiza dentro del rizoide. El tamaño de *Acetabularia* y la localización de su núcleo permiten a los investigadores quitar el núcleo de una célula y reemplazarlo por el núcleo de otra célula. En la década de 1930, J. Hämmerling aprovechó estas características únicas e intercambió los núcleos entre dos especies morfológicamente distintas, *A. mediterranea** y *A. crenulata*. Como muestra la figura 2-5A, estas dos especies tienen estructura de sombrero muy diferente. Hämmerling encontró que cuando transfería el núcleo de una especie al pedículo de otra, el sombrero nuevo formado asumía finalmente la forma asociada con el núcleo donante (fig. 2-5B). De este modo, se observó que el núcleo controla el desarrollo de *Acetabularia*.

La formación del sombrero es un evento morfogenético complejo que involucra la síntesis de numerosas proteínas, que deben ser acumuladas en una cierta porción de la célula y luego ensambladas en estructuras complejas específicas de especie. El núcleo trasplantado, a su vez, dirige la síntesis de su sombrero específico, pero le toma varias semanas hacerlo. Además, si se quita el núcleo de una célula de *Acetabularia* temprano en su desarrollo, antes que forme un sombrero, se forma un sombrero normal semanas más tarde, aunque el organismo finalmente morirá. Estos estudios sugieren que 1) el núcleo contiene información para especificar el tipo de sombrero por ser producido (es decir, contiene la información genética que especifica las proteínas requeridas para la producción de un cierto tipo de sombrero) y 2) el material que contiene esta información entra en el citoplasma mucho tiempo antes de que se lleve a cabo la producción del sombrero. Esta información en el citoplasma no es utilizada por varias semanas.

Una hipótesis actual propuesta para explicar estas observaciones es que el núcleo sintetiza un mRNA estable que se encuentra inactivo en el citoplasma hasta el tiempo de la formación del sombrero (véase Dumais y col. 2000). Esta hipótesis la apoya una observación que Hämmerling publicó en 1934. Hämmerling fraccionó jóvenes de *Acetabularias* en varias partes (fig. 2-6). Como se esperaba, la porción con el núcleo finalmente formó un nuevo sombrero, tal como lo hizo también el extremo apical del pedículo. Sin embargo, la porción intermedia del pedículo no formó un sombrero. Por esta razón, Hämmerling postuló (cerca de 30 años antes de conocerse la existencia del mRNA) que las instrucciones para la formación del sombrero eran originadas en el núcleo y fueron de algún modo almacenadas en una forma inactiva cerca del extremo del pedículo. Muchos años más tarde, los investigadores establecieron que los mRNA derivados del núcleo se acumulan en el extremo del pedículo, y que la destrucción de su mRNA o la inhibición de la síntesis de proteínas en esta región impide la formación del sombrero (Kloppstech y Schweiger 1975; Garcia y Dazy 1986; Serikawa y col. 2001).

De la discusión precedente resulta claro que la transcripción nuclear desempeña un papel importante en la formación del sombrero de *Acetabularia*, pero no sugiere que el citoplasma también tenga una función esencial en la formación del sombrero. Los mRNA no son traducidos por semanas, aunque están presentes en el citoplasma. Algo en el citoplasma controla cuándo el mensajero es utilizado. Por lo tanto, la expresión del sombrero es controlada no solamente por transcripción nuclear, sino también por la traducción del RNA citoplasmático. En este organismo unicelular, el "desarrollo" es controlado a nivel de la transcripción y de la traducción.

SITIO WEB 2-3 **Diferenciación protista (Protist differentiation).** Tres de las áreas más destacables del desarrollo de los protistas se interesan en el control del tipo de sexo en la fisión de la levadura, la transformación de la ameba *Naegleria* en una célula flagelada aerodinámica y la herencia cortical de la superficie celular en paramecios.

Protistas unicelulares y los orígenes de la reproducción sexual

La reproducción sexual es otro invento de los protistas que ha tenido un profundo efecto sobre los organismos más complejos. Cabe observar que sexo y reproducción son dos procesos distintos y separados. La **reproducción** involucra la creación de nuevos individuos. La **sexualidad** involucra la combinación de genes de dos

* Luego de un reciente cambio formal de nombre, esta especie es denominada ahora *Acetabularia acetabulum*. Por razones de simplificación, sin embargo, aquí utilizaremos la designación de Hämmerling.

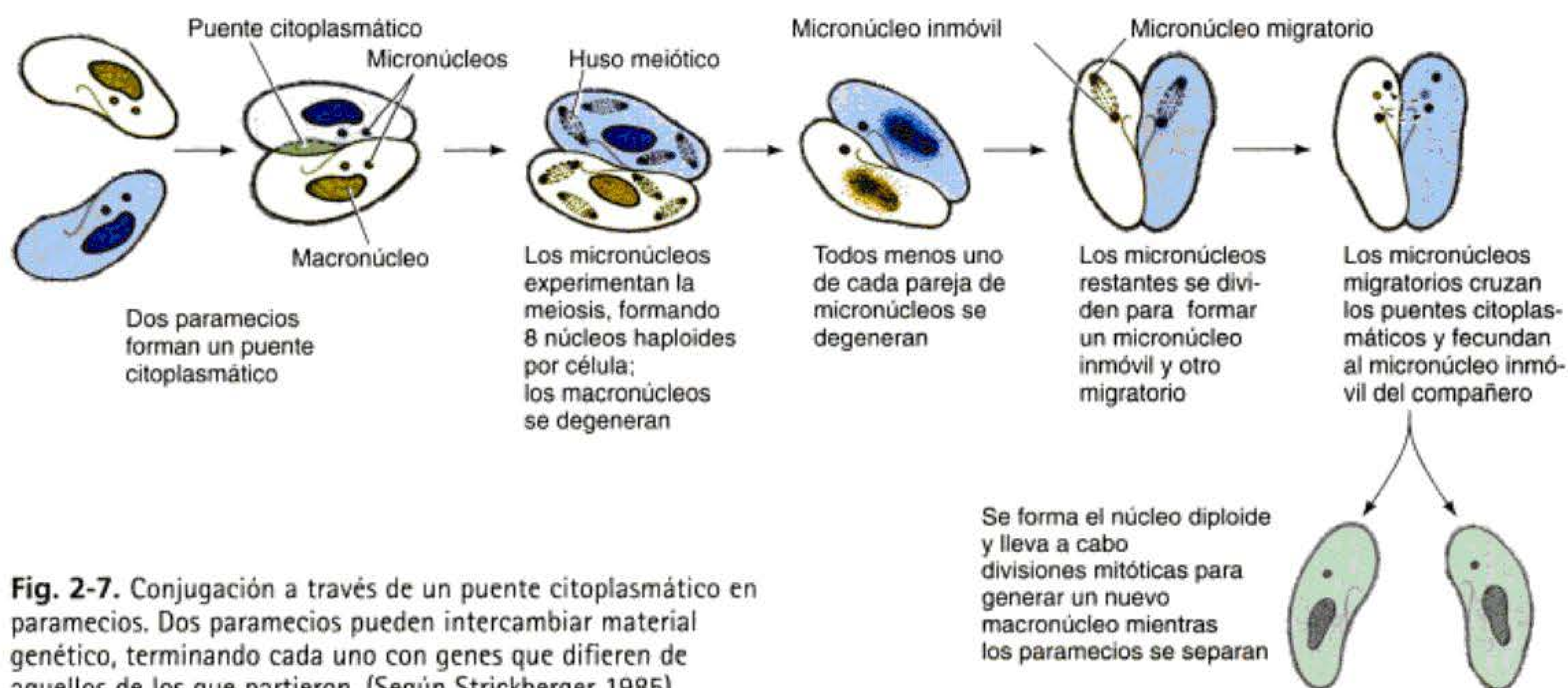


Fig. 2-7. Conjugación a través de un puente citoplasmático en paramecios. Dos paramecios pueden intercambiar material genético, terminando cada uno con genes que difieren de aquellos de los que partieron. (Según Strickberger 1985).

individuos diferentes en una nueva organización. La reproducción ante la ausencia de sexualidad es característica de organismos que se reproducen por fisión (es decir, separándose en dos); no hay redistribución de genes cuando una ameba se divide o cuando un esbozo de células de hidra forma una nueva colonia.

La sexualidad sin reproducción es también común entre organismos unicelulares. Las bacterias pueden transmitir genes de un individuo a otro por medio de pili sexuales. Esta transmisión es independiente de la reproducción. Los protistas son también capaces de redistribuir genes sin reproducirse. Los paramecios, por ejemplo, se reproducen por fisión llevando a cabo la sexualidad mediante **conjugación**. Cuando dos paramecios se encuentran, unen sus aparatos bucales y forman una conexión citoplasmática a través de la cual pueden intercambiar material genético (fig. 2-7). El macronúcleo de cada individuo (que controla el metabolismo del organismo) se degenera, mientras que cada micronúcleo lleva a cabo la meiosis para producir ocho micronúcleos haploides, de los que todos menos uno se degeneran. El micronúcleo que queda se divide una vez más para formar un micronúcleo inmóvil y un micronúcleo migratorio. Cada micronúcleo migratorio cruza el puente citoplasmático y se fusiona ("fecunda") con el micronúcleo inmóvil del compañero, creando de este modo un nuevo núcleo diploide en cada célula. Este núcleo diploide luego se divide mitóticamente para dar origen a un nuevo micronúcleo y a un nuevo macronúcleo cuando los dos compañeros se sueltan. Por esta razón, no ha habido reproducción, sino sexualidad.

La unión de estos dos procesos diferentes, sexualidad y reproducción, en la **reproducción sexual** se observa en otros eucariotas unicelulares. La figura 2-8 muestra el ciclo de vida de *Chlamydomonas*. Este organismo es usualmente haploide y tiene solo una copia de cada cromosoma (como un gameto de mamífero). Los individuos de cada especie, sin embargo, son divididos en dos **tipos o clases de apareamiento (o conjugación)**: más (+) y menos (-). Cuando uno más y uno menos se encuentran, unen sus citoplasmas y sus núcleos se fusionan para formar un cigoto diploide. Este cigoto es la única célula diploide en el ciclo de vida y finalmente experimenta la meiosis para formar cuatro nuevas células de *Chlamydomonas*. Ésta es una verdadera reproducción sexual, porque los cromosomas son segregados durante la división meiótica y se forman más individuos.

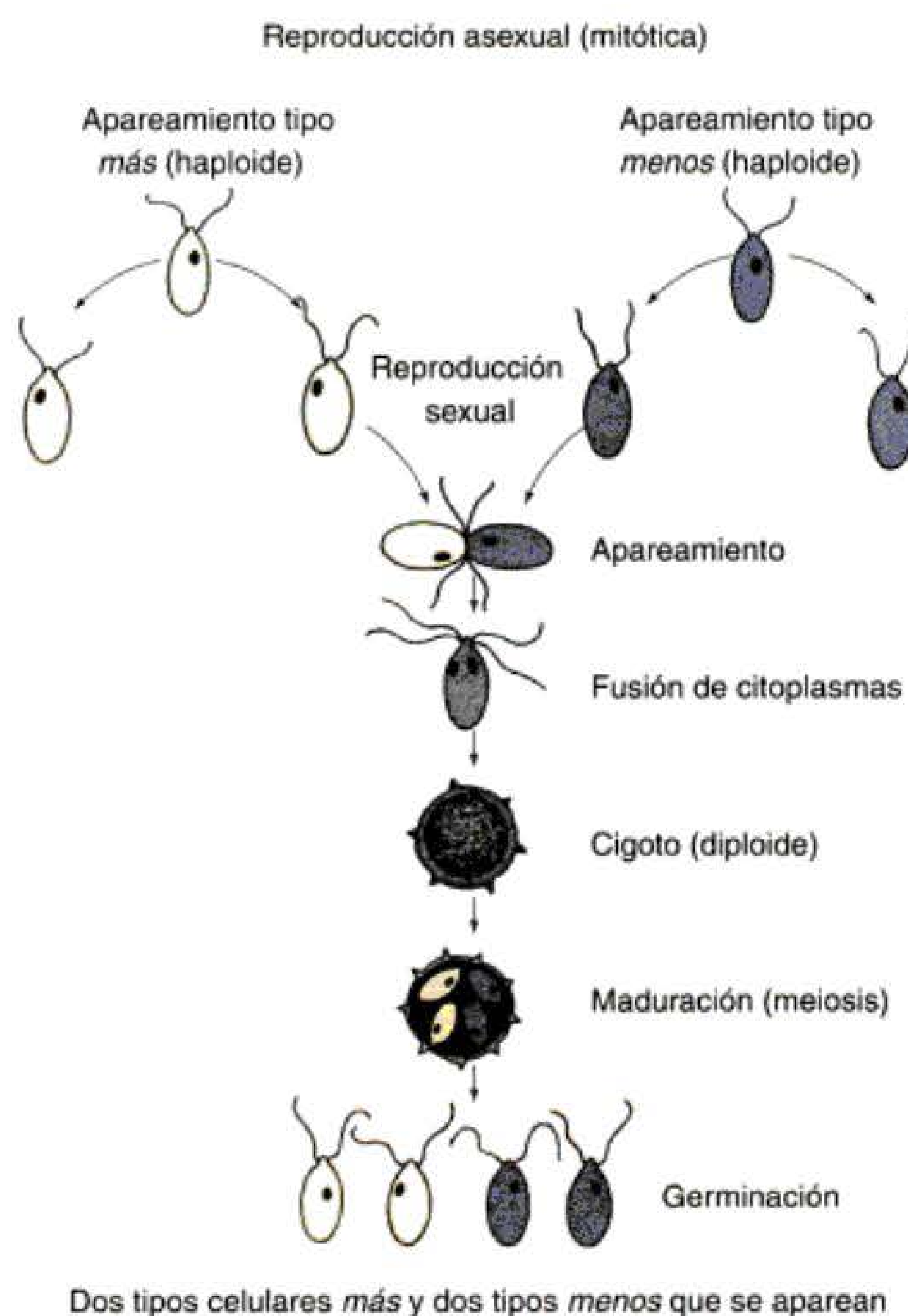


Fig. 2-8. Reproducción sexual en *Chlamydomonas*. Dos tipos de células que se aparean, ambas haploides, pueden reproducirse asexualmente cuando están separadas. Bajo ciertas condiciones, los dos tipos de células que se aparean pueden unirse para producir una célula diploide que puede experimentar la meiosis para formar cuatro nuevos organismos haploides. (Según Strickberger 1985.)

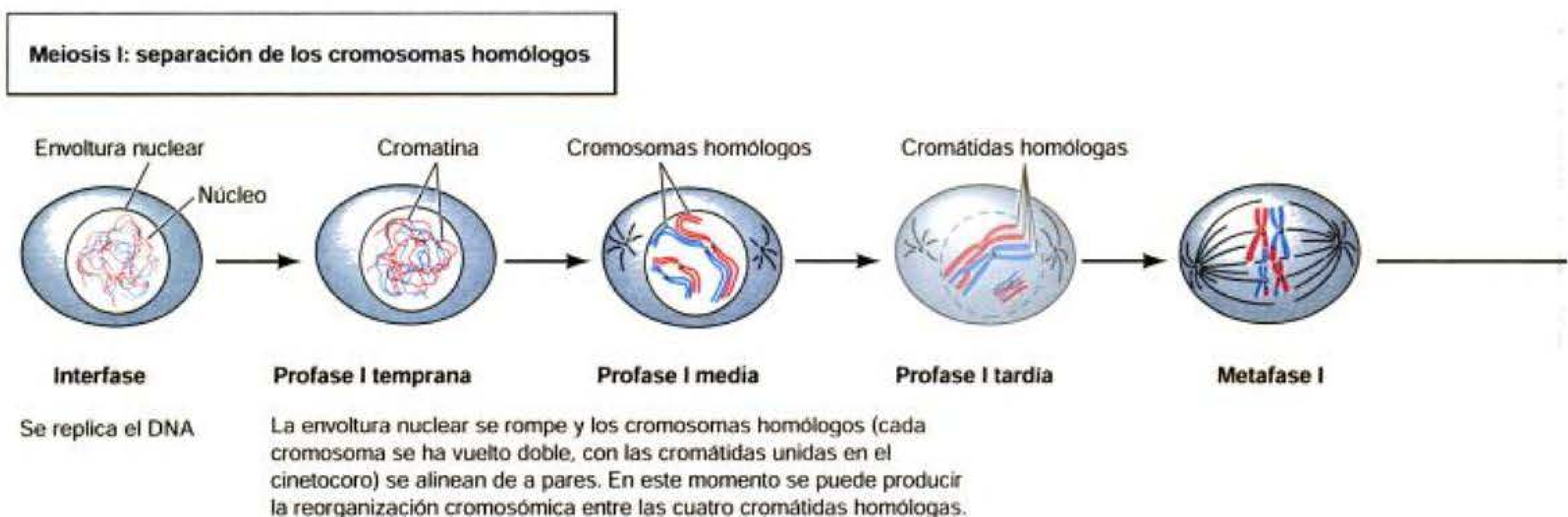


Fig. 2-9. Resumen de la meiosis. El DNA y sus proteínas asociadas se replican durante la interfase. Durante la profase, se rompe la envoltura nuclear y los cromosomas homólogos (cada cromosoma es doble, con las cromátidas unidas en el cinetocoro) se alinean en parejas. En este momento se pueden producir las reorganizaciones cromosómicas entre las cuatro cromátidas homólogas. Después de la primera metafase, se segregan los dos cromosomas homólogos originales en diferentes células. Durante la segunda división meiótica, el cintecoro se escinde y las cromátides hermanas separadas, dejan a cada nueva célula con una copia de cada cromosoma.

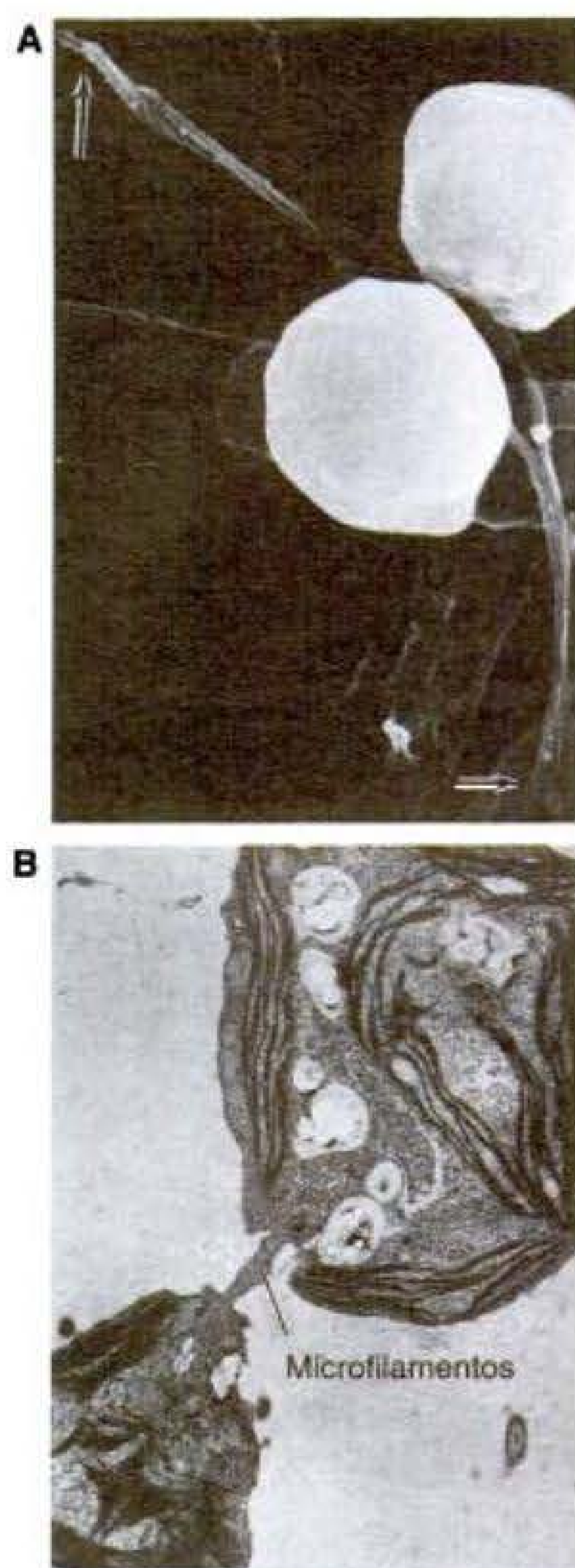
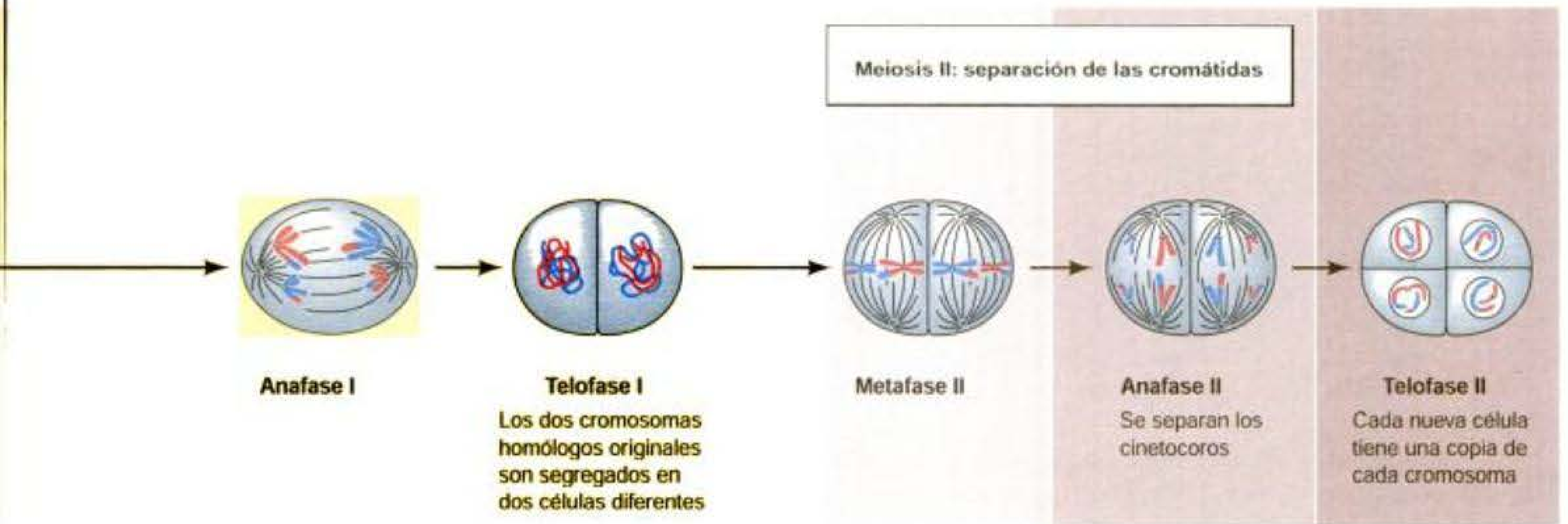


Fig. 2-10. Reconocimientos de dos pasos en el acoplamiento de *Chlamydomonas.* **A.** Microfotografía electrónica de barrido (x7000) del par en apareamiento. Los flagelos que interactúan se enrollan uno alrededor del otro, adhiriéndose en los extremos (flechas). **B.** Microfotografía electrónica de transmisión (x20.000) de un puente citoplasmático que conecta los dos organismos. Los microfilamentos de actina se extienden desde la célula donante (inferior) hasta la célula receptora (superior). (De Goodenough y Weiss 1975 y Bergman y col. 1975; fotografía cortesía de U. Goodenough.)

Observe que en este tipo de reproducción sexual de protista, los gametos son morfológicamente idénticos; la distinción entre espermatozoide y gameto femenino no ha sido hecha.

En la evolución de la reproducción sexual, se han obtenido dos importantes avances. El primero fue el mecanismo de meiosis (fig. 2-9), según el cual el complemento diploide de cromosomas es reducido a un estado haploide (discutido en detalle en el capítulo 19). El segundo fue un mecanismo por el cual los dos tipos de apareamiento diferentes pueden reconocerse uno al otro. En *Chlamydomonas*, primero se produce el reconocimiento sobre la membrana flagelar (fig. 2-10; Bergman y col. 1975; Wilson y col. 1997; Pan y Snell 2000). Los flagelos de dos individuos se enrollan uno alrededor del otro, permitiendo que se acerquen regiones específicas de la membrana celular. Estas regiones especializadas contienen componentes específicos de los dos tipos de apareamiento que posibilitan la fusión de los citoplasmas. Luego de la aglutinación flagelar, el individuo más comienza la fusión mediante la extensión de un tubo de fecundación. Este tubo contacta y se fusiona con un sitio específico sobre el individuo menos. Curiosamente, el mecanismo utilizado para extender este tubo –la polimerización de la proteína actina para formar microfilamentos– es también utilizado para extender los procesos del espermatozoide y de los huevos del erizo de mar. En el capítulo 7, se verá que el reconocimiento y fusión del espermatozoide con el ovocito se produce de un modo asombrosamente similar.

Los eucariotas unicelulares parecen poseer los elementos básicos de los procesos de desarrollo que caracterizan a los organismos más complejos: la síntesis de proteínas es controlada de modo tal que ciertas proteínas son hechas solo en ciertos tiempos y en ciertos lugares; las estructuras de genes individuales y de los cromosomas son como ellos estarán a través de la evolución eucariótica; la mitosis y la meiosis han sido perfeccionadas; y existe la reproducción sexual, que involucra la cooperación entre células individuales. Esta cooperación intercelular llega a ser aún más importante con la evolución de los organismos multicelulares.



Multicelularidad: la evolución de la diferenciación

Uno de los experimentos más importantes de la evolución fue la creación de organismos multicelulares. Parecen ser varios los caminos por los que las células individuales evolucionaron a organizaciones multicelulares; aquí discutiremos solo dos de ellos (véase cap. 22 para una explicación más completa). La primera opción involucra la división ordenada de la célula reproductora y la posterior diferenciación de su progenie en tipos celulares diferentes. Este camino hacia la multicelularidad puede ser visto en una destacada serie de organismos multicelulares referidos colectivamente como de la familia Volvocales -Volvocaceae o los volvocaceans- (Kirk 1999, 2000).

Los Volvocales

Los organismos más simples entre los volvocales son agrupaciones ordenadas de numerosas células, cada una asemejándose al protista unicelular *Chlamydomonas*, con el que están relacionadas (fig. 2-11A). Un único organismo de volvocales género *Gonium* (fig. 2-11B), por ejemplo, consiste en un disco aplanado de 4 a 16 células, cada

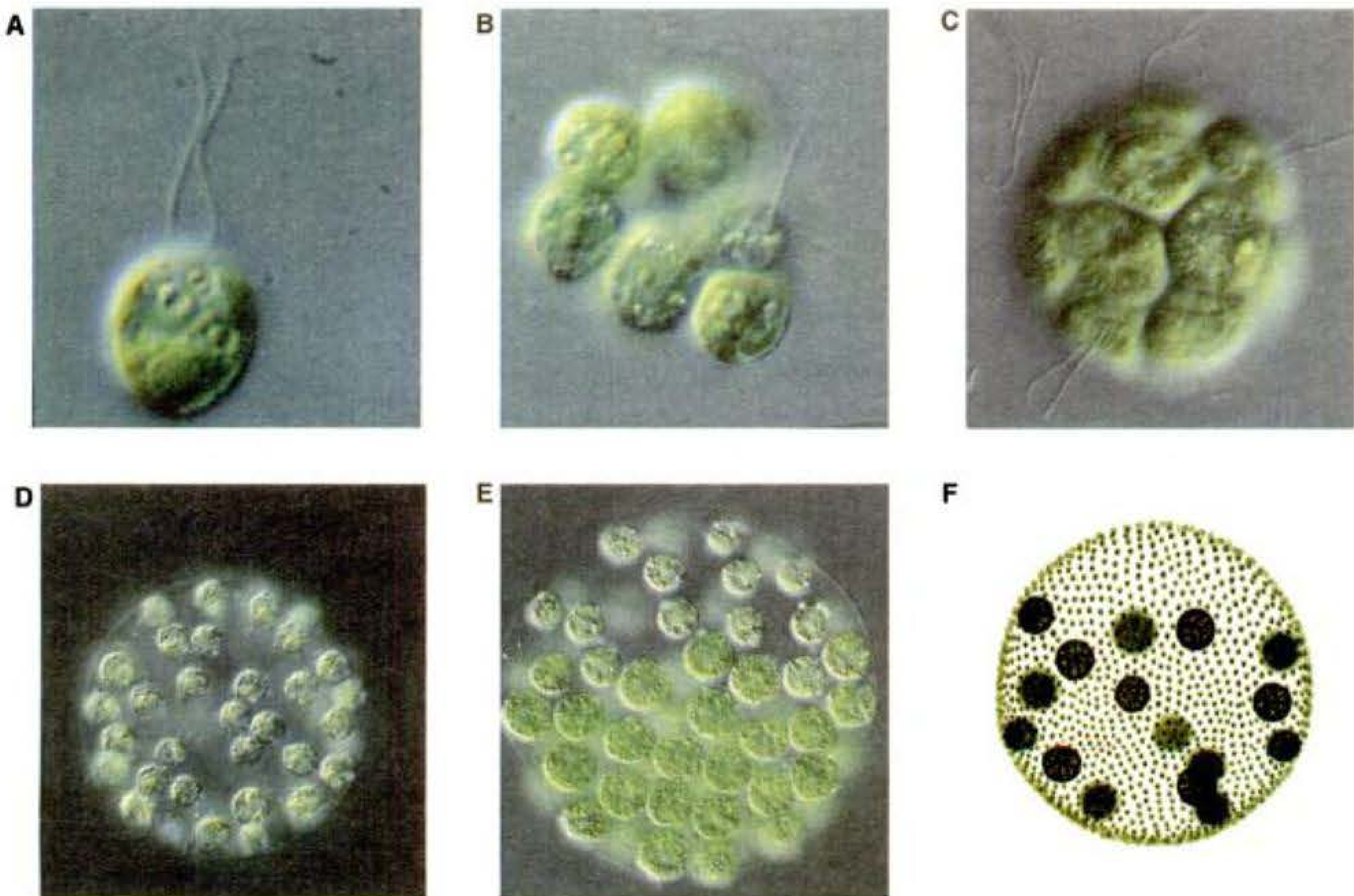


Fig. 2-11. Representante del orden de los Volvocales. Todos excepto *Chlamydomonas* son miembros de la familia Volvocales. **A.** El protista unicelular *Chlamydomonas reinhardtii.* **B.** *Goniun pectorale*, con 8 células semejantes a *Chlamydomonas* en un disco convexo. **C.** *Pandorina morum.* **D.** *Eudorina elegans.* **E.** *Pleodorina californica.* Aquí, las 64 células son originalmente semejantes, pero las posteriores se desdiferencian y rediferencian como células reproductoras sexuales denominadas gonidios, mientras que las células anteriores se mantienen pequeñas y biflageladas, como *Chlamydomonas.* **F.** *Volvox carteri.* Aquí, las células destinadas a convertirse en gonidios son separadas temprano en el desarrollo y nunca tienen características somáticas. Las células somáticas más pequeñas se parecen a *Chlamydomonas.* La complejidad se incrementa a partir de *Chlamydomona* unicelular hasta *Volvox* multicelular. (Fotografías cortesía de D. Kirk.)

uno con su propio flagelo. En un género relacionado, *Pandorina*, las 16 células forman una esfera (fig. 2-11C) y en *Eudorina*, la esfera contiene 32 a 64 células organizadas en un patrón regular (fig. 2-11D). En estos organismos, entonces, se ha elaborado un principio muy importante de desarrollo: la división ordenada de una célula para generar un número de células que está organizada de un modo previsible. De modo similar a la segmentación de la mayoría de los embriones animales, las divisiones celulares por las que una única célula de volvocale produce un organismo de 4 a 64 células se produce en una secuencia muy rápida y en ausencia de crecimiento celular.

Los dos géneros siguientes de la serie de volvocales exhiben otro principio de desarrollo importante: la diferenciación de tipos celulares dentro de un organismo individual. En estos organismos, las células reproductivas están diferenciadas de las células somáticas. En todos los géneros mencionados anteriormente, cada célula puede, y normalmente lo hace, producir un organismo nuevo completo por mitosis. Sin embargo, en los géneros *Pleodorina* y *Volvox* relativamente pocas células pueden reproducirse. En *Pleodorina californica* (fig. 2-11E), las células en la región anterior están restringidas a funciones somáticas; solo aquellas células de la región posterior pueden reproducirse. En *P. californica*, una colonia generalmente tiene de 128 o 64 células, y la proporción entre el número de células somáticas y el número de células reproductivas es usualmente 3:5. Por lo tanto, una colonia de 128 células tiene típicamente 48 células somáticas y una colonia de 64 células tiene 24.

En *Volvox*, casi todas las células son somáticas y muy pocas células pueden producir nuevos individuos. En algunas especies de *Volvox*, las células reproductoras, como en *Pleodorina*, derivan de células que originalmente se parecen y funcionan como células somáticas antes de aumentar de tamaño y dividirse para formar una nueva progenie. Sin embargo, en otros miembros del género, como en *V. carteri*, hay una división completa del trabajo: las células reproductoras que crearán la siguiente generación son separadas durante la división de la célula original que está formando un nuevo individuo. Las células reproductoras nunca desarrollan flagelos funcionales ni contribuyen a la movilidad o con otras funciones somáticas del individuo; están especializadas enteramente para la reproducción.

De este modo, aunque los volvocales más simples pueden ser pensados como organismos coloniales (debido a que cada célula es capaz de existencia independiente y de perpetuar la especie), en *V. carteri* tenemos un organismo multicelular verdadero con dos tipos celulares distintos e interdependientes (somático y reproductor), que son requeridos para la perpetuación de la especie (fig. 2-11F). Aunque no todos los animales separan a las células reproductoras de las células somáticas (y las plantas casi nunca lo hacen), la separación de las células germinales de las células somáticas en el desarrollo temprano es característico de muchos filos animales y será discutido en más detalle en el capítulo 19.

SITIO WEB 2-4 **Diferenciación celular de *Volvox* (*Volvox* cell differentiation).** Los caminos que conducen a células germinales o a células somáticas son controlados por genes que llevan a las células a seguir uno u otro destino. Las mutaciones pueden impedir la formación de uno de estos linajes.

Información adicional y especulaciones

Sexo e individualidad en Volvox

Simple como es, *Volvox* comparte muchas características que distinguen a los ciclos de vida y a las historias de desarrollo de organismos mucho más complejos, incluidos nosotros mismos. Como ya hemos mencionado, *Volvox* está entre los organismos más simples que exhiben una división del trabajo entre dos tipos celulares completamente diferentes. Por consiguiente, está entre los organismos más simples que incluyen la muerte como una parte habitual genéticamente regulada de su historia de vida.

Muerte y diferenciación

Los organismos unicelulares que se reproducen por división celular simple, como las amebas, son potencialmente inmortales. Las amebas que se pueden ver hoy en día bajo el microscopio no tienen ancestros muertos. Cuando una ameba se divide, ninguna de las dos células resultantes puede ser considerada ancestro o hija: son hermanas. La muerte llega a una ameba solo si ésta es comida o se encuentra con un accidente fatal, y cuando esto sucede, la célula muerta no deja hijas.

Sin embargo, la muerte se convierte en una parte esencial de la vida para un organismo multicelular que establece una división de trabajo entre células somáticas (cuerpo) y células germinales (reproductora). Considerar la historia de vida de *Volvox carteri* cuando está reproduciéndose asexualmente (fig. 2-12). Cada adulto asexual es un esferoide que contiene unas 2000 células somáticas pequeñas biflageladas a lo largo de su periferia y cerca de 16 células reproductoras grandes asexuales, denominadas **gonidios**, hacia un extremo del interior. Cuando madura, cada gonidio se divide rápidamente 11 o 12 veces. Algunas de estas divisiones son asimétricas y producen 16 grandes células que se convertirán en un nuevo grupo de gonidios en la siguiente generación. Al final de la segmentación, se han producido a partir del gonidio todas las células que estarán presentes en un adulto. Pero el embrión obtenido es "el interior hacia afuera": ahora es una esfera hueca con sus gonidios sobre el exterior y los flagelos de sus células somáticas señalando hacia el interior. Este aprieto es corregido por un proceso denominado **inversión**, en el que el embrión gira

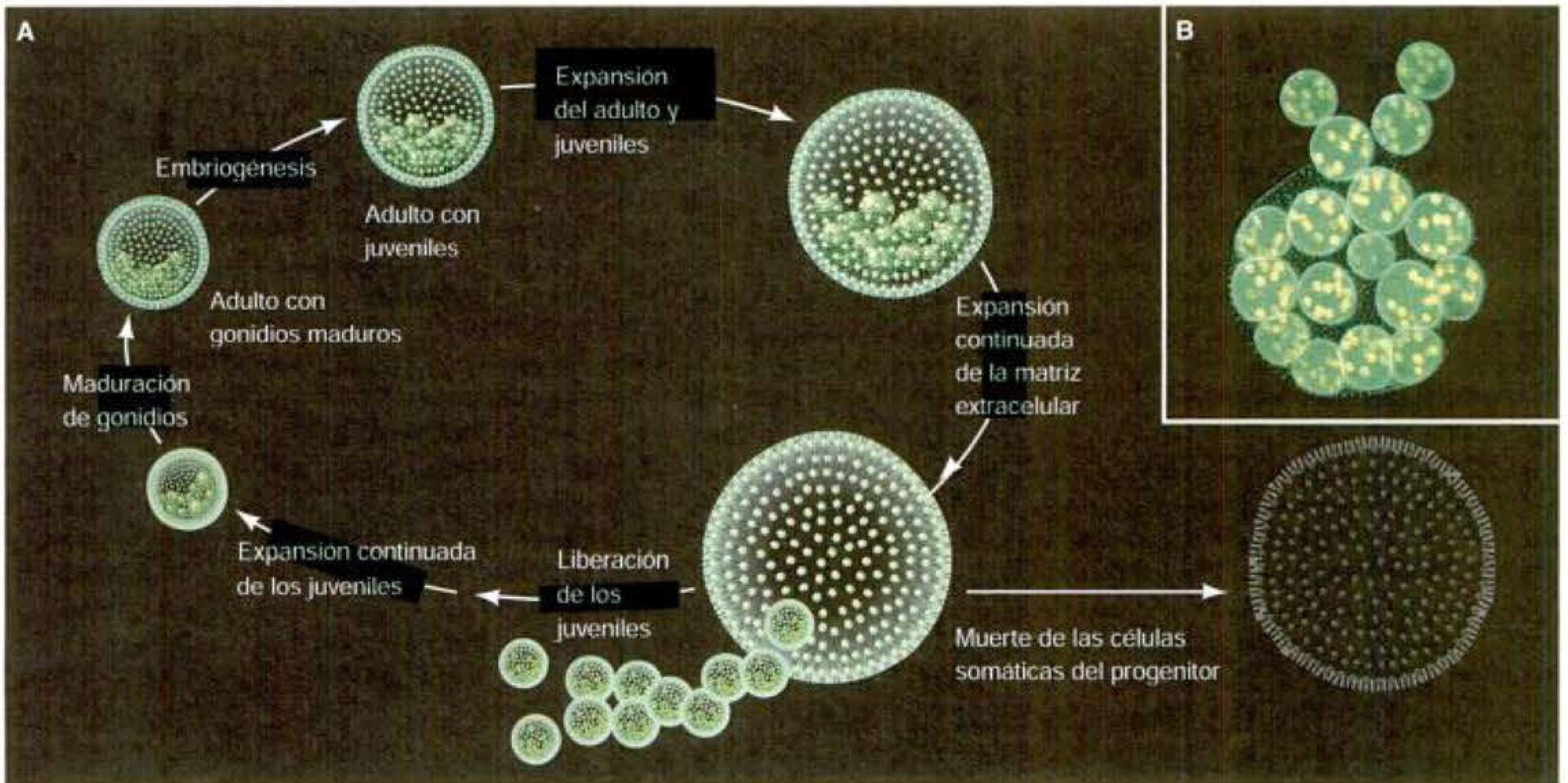


Fig. 2-12. Reproducción asexual en *V. carteri.* **A.** Cuando las células reproductoras (gonidios) están maduras, ingresan en un estadio similar a la segmentación del desarrollo embrionario para producir juveniles dentro del adulto. A través de una serie secuencial de movimientos celulares que se asemejan a la gastrulación, el *Volvox* embrionario se invierte y es finalmente liberado de su progenitor. Las células somáticas del progenitor, que carecen de gonidios, experimentan envejecimiento y muerte celular programada, mientras que maduran los *Volvox* juveniles. El ciclo sexual completo toma 2 días. **B.** Microfotografía que muestra esferas adultas jóvenes de *Volvox carteri* liberadas de sus progenitores para llegar a ser individuos que nadan libremente. (Según Kirk 1988; B, de Kirk 2001b.)

sobre su lado derecho hacia afuera por un grupo de movimientos que se parecen a los movimientos de la gastrulación del embrión animal (fig. 2-13A-H). Grupos de células con forma de botella abren un agujero en un extremo del embrión al producir tensión sobre la lámina de células interconectadas (fig. 2-13I). El embrión realiza su inversión a través de este orificio que a continuación se cerrará. Cerca de un día después que esto ha sucedido, el *Volvox* juvenil es liberado enzimáticamente de sus padres y se aleja nadando.

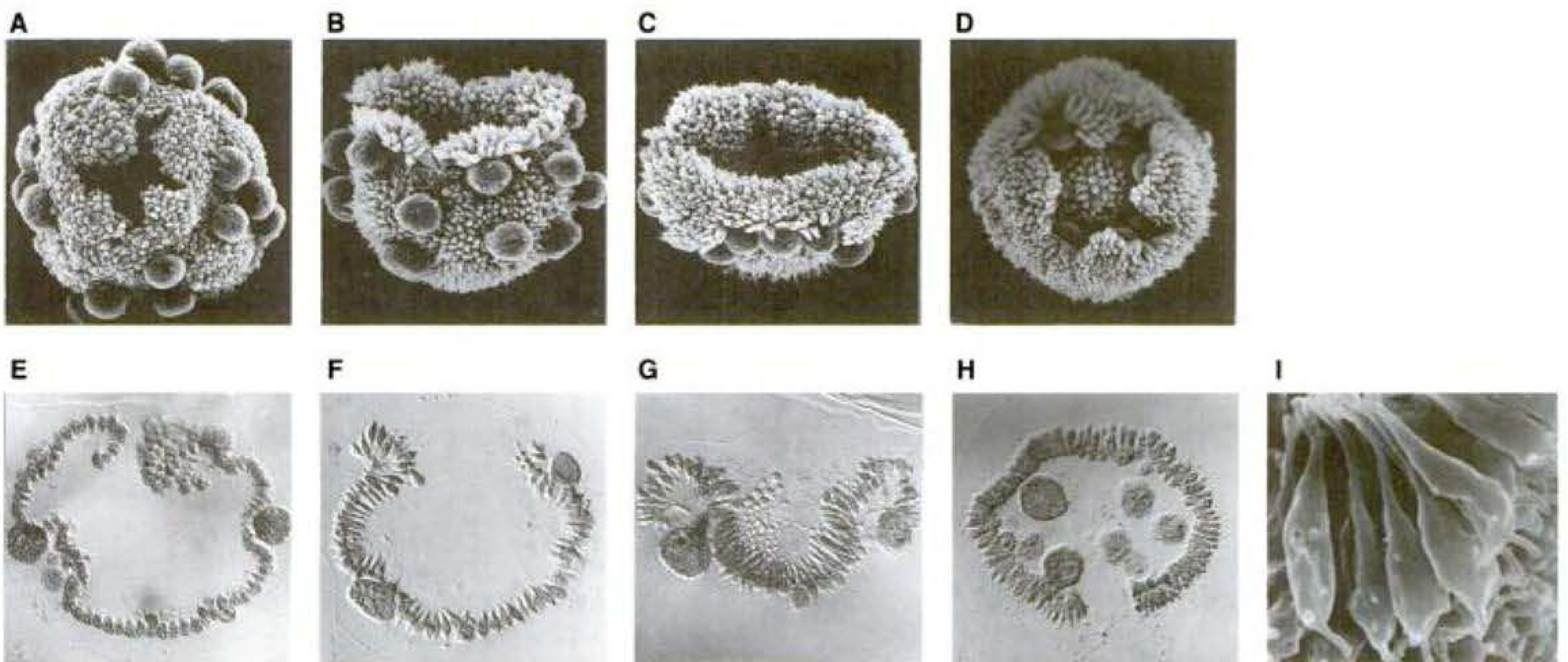


Fig. 2-13. Inversión de embriones de *V. carteri.* **A-D.** Micrografías electrónicas de barrido de embriones enteros. **E-H.** Secciones sagitales a través del centro del embrión, visualizadas mediante microscopio de interferencia diferencial. Antes de la inversión, el embrión es una esfera hueca de células conectadas con los nuevos gonidios sobre el exterior. Cuando las "células en botella" cambian su forma, un orificio (el filaloporo) se abre en el vértice del embrión **(A,B,E,F)**. Las células entonces se enroscan alrededor y se vuelven a juntar en el fondo **(C,D,G,H)**. El nuevo gonidio se encuentra ahora en el interior. **(I)** "Células en botella" cerca de la apertura del "fialoporo" en un embrión de *V. carteri.* Estas células se mantienen estrechamente interconectadas a través de puentes citoplasmáticos cerca de sus ápices alargados, creando así la tensión que provoca la curvatura de la lámina de células interconectadas. (De Kirk y col. 1982; fotografía cortesía de D. Kirk.)

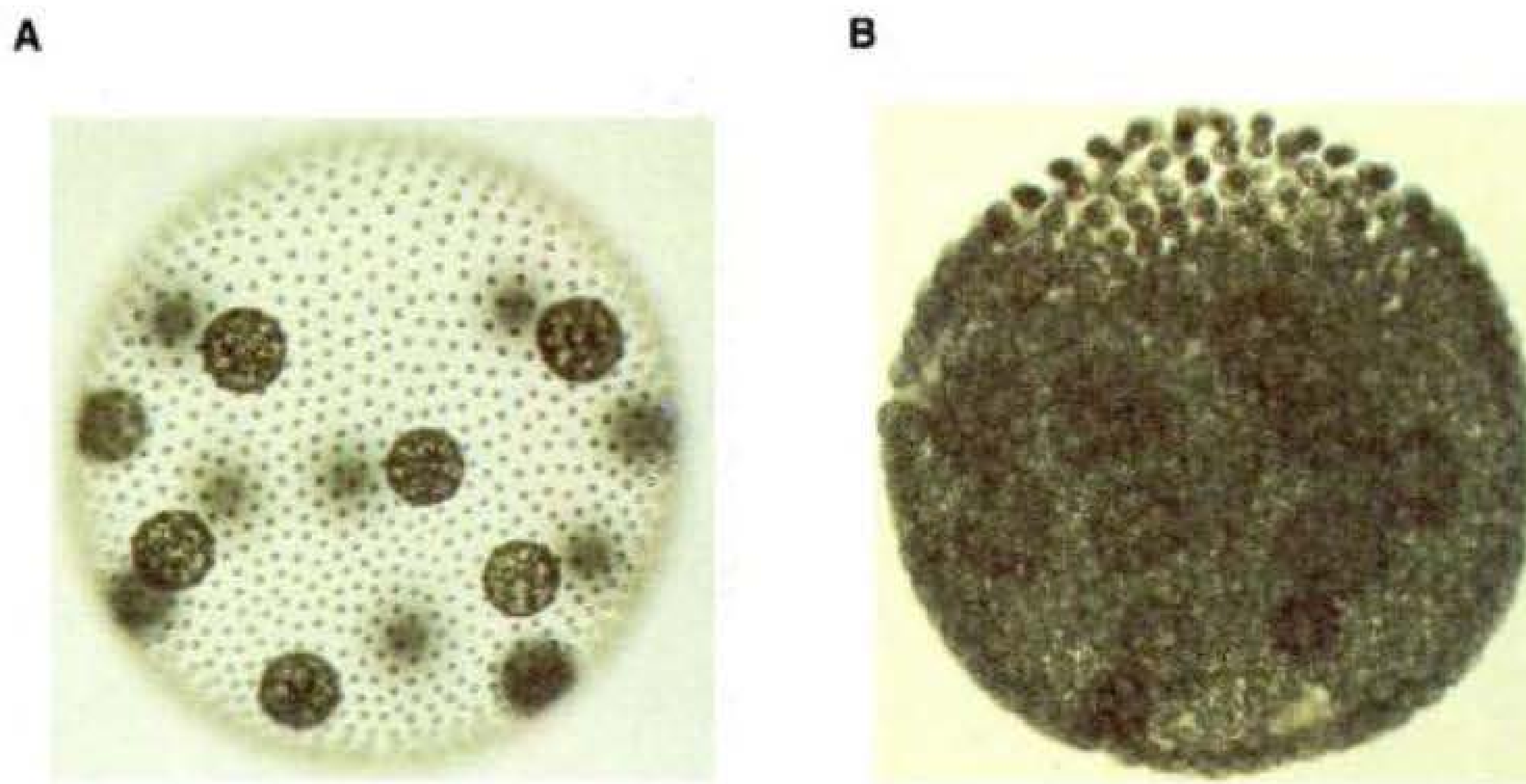


Fig. 2-14. La mutación de un solo gen (*regenerador somático A*) elimina la muerte celular programada en *V. carteri*. **A.** Un *Volvox* recién nacido portando esta mutación es indistinguible del esferoide tipo salvaje. **B.** Poco antes del tiempo en el que las células somáticas del esferoide tipo salvaje comienzan a morir, las células somáticas del mutante se vuelven a diferenciar como gonidios **(B)**. Finalmente, cada célula del mutante se dividirá para regenerar un nuevo esferoide que repetirá su ciclo de desarrollo potencialmente inmortal. (Fotografía cortesía de D. Kirk.)

¿Qué les sucede a las células somáticas del *Volvox* "paterno" ahora que su joven ha "dejado el hogar"? Al haber producido hijos y ser incapaz de futuras reproducciones, estas células somáticas mueren. En realidad, estas células se comprometen al suicidio, sintetizando un grupo de proteínas que causan la muerte y la disolución de las células que las producen (Pommerville y Kochert 1982). Además, al morirse, estas células liberan para el uso de otras, incluidas sus propias hijas, todos los nutrientes que ellas han almacenado durante la vida. "Así emerge" observó David Kirk, "uno de los grandes tópicos de la vida sobre el planeta Tierra: 'Algunos mueren para que otros puedan vivir'.

En *V. carteri*, un gen específico, *regulador somático* A, o *regA*, desempeña un papel central en la regulación de la muerte celular (Kirk 1988, 2001a). Este gen es expresado solo en las células somáticas e impide la expresión de los genes de los gonidiales. En las estirpes de laboratorio que poseen mutaciones reguladoras de este gen, las células somáticas comienzan a expresar *regA*, abandonan su camino suicida, obtienen la habilidad para reproducirse asexualmente y llegan a ser potencialmente inmortales (fig. 2-14). El hecho de que tales mutantes nunca han sido encontrados en la naturaleza indica que esta muerte celular desempeña con mucha probabilidad un papel importante en la supervivencia de *V. carteri* bajo condiciones naturales.

Incorporando el sexo

Aunque *V. cartery* se reproduce asexualmente la mayoría del tiempo, en la naturaleza se reproduce sexualmente una vez al año. Cuando lo hace, una generación de individuos desaparece y se produce una generación nueva y genéticamente diferente. El naturalista Joseph Wood Krutch (1956, págs. 28-29) lo dijo más poéticamente:

> *La ameba y el paramecio son potencialmente inmortales... Pero para el Volvox, la muerte parece ser algo tan inevitable como sucede en el ratón o en el hombre. El Volvox debe morir tal como Leeuwenhoek vio, que este muere porque tiene hijos y no se lo necesita mucho más. Cuando se acerca su momento cae silenciosamente al fondo y se une a sus ancestros. Como Hegner, el zoólogo del Johns Hopkins, una vez escribió, 'Éste es el primer advenimiento de la inevitable muerte natural en el reino animal y todo por el sexo'. Y se preguntó: '¿Vale la pena?'*

Para *Volvox carteri*, sin duda vale la pena. *V. carteri* vive en lagunas temporarias poco profundas que se llenan con lluvias de primavera pero que se secan con el calor del verano tardío. Entre estas épocas, *V. carteri* nada reproduciéndose asexualmente. Estos volvox asexuales morirán en minutos una vez que la laguna se seca. *V. carteri* puede sobrevivir por cambio sexual poco antes de que la laguna desaparezca produciendo cigotos aletargados que sobreviven al calor y a la sequía de la última parte del verano y al frío del invierno. Cuando la lluvia llena las lagunas en la primavera, los cigotos rompen su inactividad y nace una nueva generación de individuos que se reproduce asexualmente hasta que la laguna esté próxima a secarse una vez más.

¿Cómo hacen estos organismos simples para predecir con tanta precisión el comienzo de las condiciones adversas para que puedan producir una generación sexual justo a tiempo, año tras año? Se sabe que el estímulo para cambiar del modo de reproducción asexual al sexual en *V. carteri* es una proteína inductora sexual de 30-kDa. Esta proteína es tan poderosa que concentraciones tan bajas como 6×10^{-17} *M* hacen que el gonidio experimente un patrón modificado de desarrollo embrionario que resulta en la producción de huevos (gametos femeninos) o espermatozoides, dependiendo del sexo genético individual (Sumper y col. 1993). El espermatozoide es liberado y nada hacia una hembra, donde fecundan huevos (gametos femeninos) para producir cigotos aletargados (fig. 2-15). La proteína inductora sexual puede funcionar a concentraciones tan sorprendentemente bajas debido a que causa leves modificaciones de la matriz extracelular. Estas modificaciones parecen indicar la transcripción de toda una batería de genes que forman los gametos (Sumper y col. 1993; Hallmann y col. 2001).

¿Cuál es la fuente de esta proteína inductora sexual? Kirk y Kirk (1986) descubrieron que el ciclo sexual puede ser iniciado calentando platos de *V. carteri* a temperaturas que podrían esperarse en la laguna de aguas bajas en la última parte del verano. Cuando se hizo esto, las células somáticas de los volvox asexuales produjeron la proteína inductora sexual. Debido a que la cantidad de proteína inductora sexual secretada por un individuo es suficiente para iniciar el desarrollo sexual de unos 500 millones de volvox asexuales, la inducción de un solo volvox puede convertir una laguna entera a la sexualidad. Este descubrimiento explicó una observación hecha 90 años antes que "en el resplandor completo de la luz del sol de Nebraska, *Volvox* puede aparecer, multiplicarse y descontrolarse en la reproducción sexual en charcas de agua de lluvia de apenas una quincena de duración" (Powers 1908). De este modo, en las lagunas temporarias

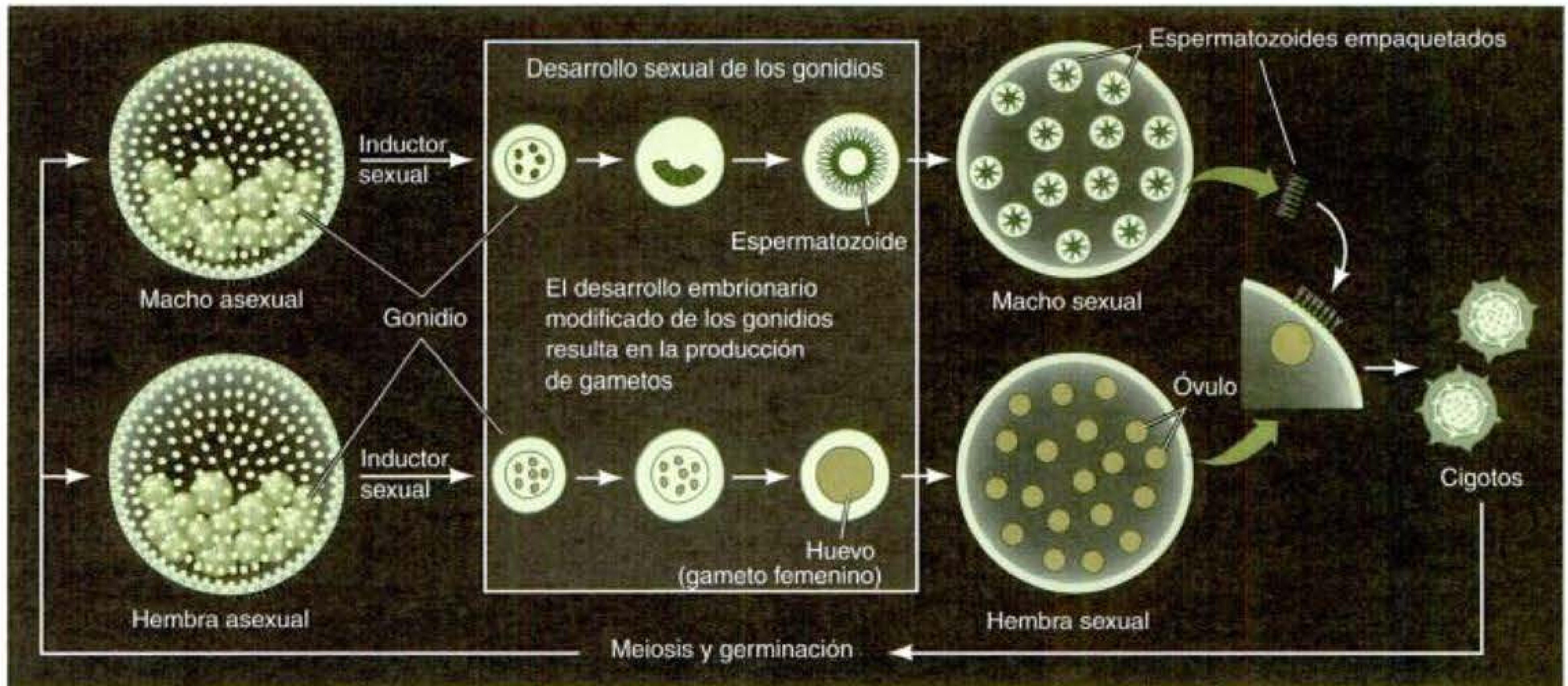


Fig. 2-15. Reproducción sexual en *V. carteri*. Machos y hembras son indistinguibles en su fase asexual. Cuando la proteína inductora sexual está presente, el gonidio de ambos tipos de apareamiento experimenta una embriogénesis modificada que lleva a la formación de huevos en hembras (gametos femeninos) y espermatozoides en machos. Cuando los gametos están maduros, los paquetes de espermatozoides (cada uno con 64 o 128 espermatozoides) son liberados y nadan hacia las hembras. Para alcanzar la hembra, el paquete de espermatozoides se rompe en espermatozoides individuales, que pueden fecundar los huevos (gametos femeninos). El cigoto inactivo que resulta tiene una pared celular dura que puede resistir la desecación, el calor y el frío. Cuando las lluvias de primavera hacen que el cigoto germine, éste sigue la meiosis para producir machos y hembras haploides que se reproducen asexualmente hasta que el calor induce nuevamente el ciclo sexual.

formadas por las lluvias de primavera y que se secan en el calor del verano, el volvox ha encontrado un medio de supervivencia: usa el calor para inducir la formación de individuos sexuales cuyos apareamientos producen cigotos capaces de sobrevivir en condiciones que matarían al organismo adulto. Nosotros vemos, también, que el desarrollo está ligado críticamente al ecosistema en el que el organismo se ha adaptado para sobrevivir.

Aunque todos los volvocales, como sus parientes unicelulares *Chlamydomonas*, se reproducen predominantemente por medio asexual, también son capaces de reproducción sexual, que involucra la producción y fusión de gametos haploides. En muchas especies de *Chlamydomonas*, incluyendo la ilustrada en la figura 2-10, la reproducción sexual es **isogámica** ("el mismo gameto"), debido a que los gametos haploides que se encuentran son semejantes en tamaño, estructura y motilidad. Sin embargo, en otras especies de *Chlamydomonas* –así como en muchas especies de volvocales coloniales– nadan gametos de muy diferentes tamaños que son producidos para los diferentes tipos que se aparean. Este patrón se denomina **heterogamia** ("diferentes gametos"). Pero los volvocales más grandes han evolucionado a una forma especializada de heterogamia denominada **oogamia**, que involucra la producción de huevos (gametos femeninos) grandes, relativamente inmóviles por un tipo de apareamiento y espermatozoides pequeños y móviles por el otro tipo de apareamiento (véase Información adicional y especulaciones). Aquí veremos un tipo de gameto especializado para la retención de nutrientes y de los recursos de desarrollo y el otro tipo de gameto especializado para el transporte de los núcleos. Por lo tanto, los volvocales incluyen los organismos más simples que han distinguido miembros macho y hembra de la especie y que tienen distintos caminos de desarrollo para la producción del huevo (gameto femenino) o del espermatozoide.

En todos los volvocales, la reacción de fecundación se asemeja a la de *Chlamydomonas* en las que ésta resulta en la producción de un cigoto diploide aletargado que es capaz de sobrevivir a severas condiciones ambientales. Cuando las condiciones le permiten al cigoto germinar, éste experimenta primero la meiosis para producir recién nacidos haploides de dos tipos diferentes de apareamiento en igual número.

Diferenciación y morfogénesis en Dictyostelium: *adhesión celular*

CICLO DE VIDA DE *DICTYOSTELIUM.* Otro tipo de organización multicelular derivada de organismos unicelulares es hallada en *Dictyostelium discoideum*.* El ciclo de vida de este fascinante organismo se representa en la figura 2-16. En su ciclo asexual, la ameba haploide solitaria (denominada mixameba o "ameba social" para distinguirla de las especies de ameba que siempre se mantienen solitarias) vive en troncos en descomposición, se alimenta de bacterias y se reproduce por fisión binaria. Cuando han agotado su suministro de comida, decenas de millares de estas mixamebas se unen para formar

* Aunque en el lenguaje coloquial denominado "moho celular del fango (del limo o mucilaginoso)," *Dictyostelium* no es un moho ni es constantemente fangoso (o baboso). Tal vez lo más apropiado sería pensar a *Dictyostelium* como una ameba social.

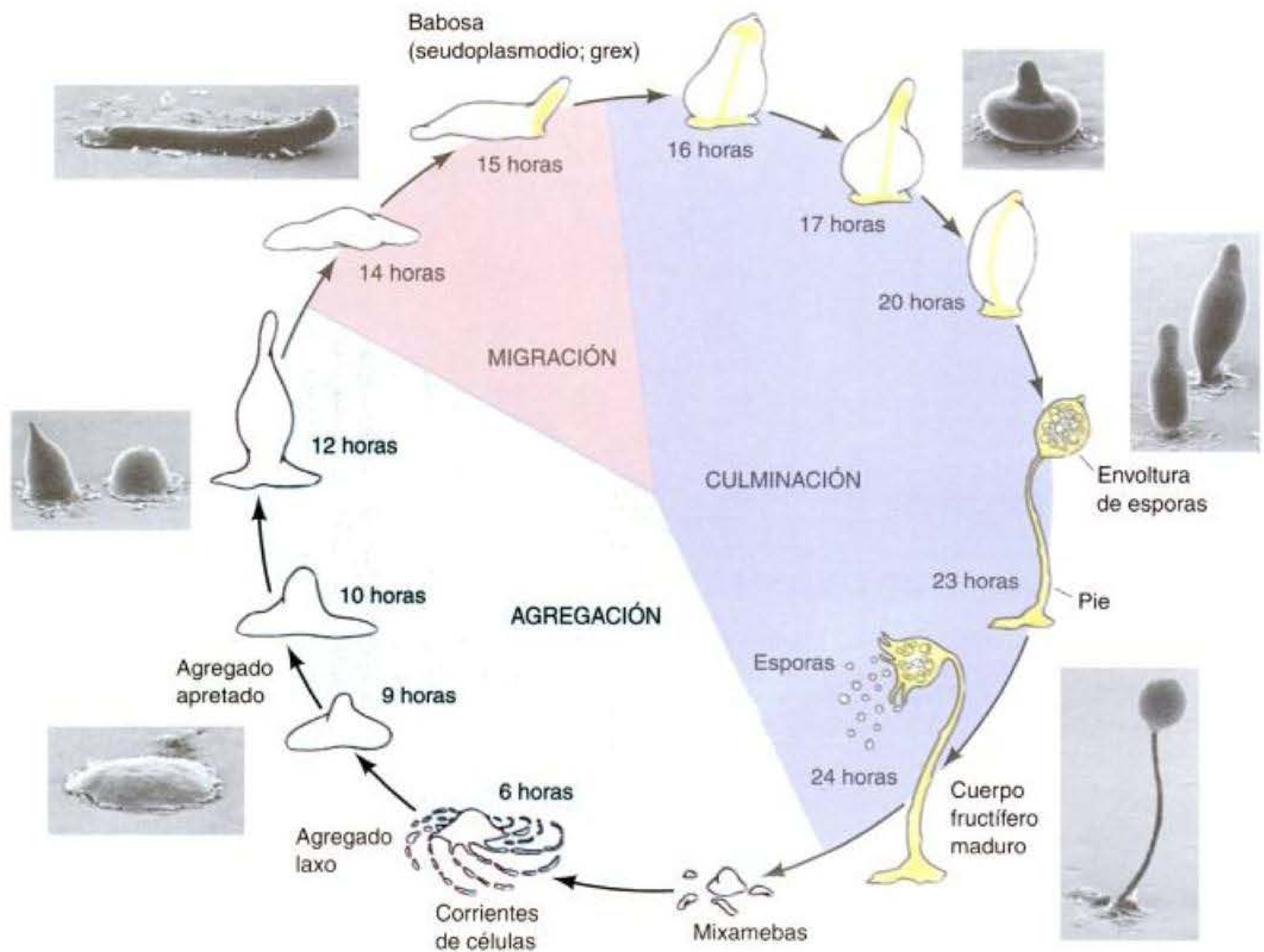


Fig. 2-16. Ciclo vital de *Dictyostelium discoideum*. Las esporas haploides dan origen a las mixamebas, que se pueden reproducir asexualmente para formar más mixamebas haploides. Cuando el suplemento de nutrientes disminuye, se produce la agregación y se forma una babosa que migra. La babosa culmina en un cuerpo fructífero que libera más esporas. El tiempo se refiere a horas desde el comienzo de la carencia de nutrientes. Las células precursoras de esporas están indicadas en amarillo. (Fotografías cortesía de R. Blanton y M. Grimson.)

corrientes de células que convergen en un punto central. Allí, se apilan una encima de la otra para producir un montículo cónico denominado agregado apretado. Posteriormente, se origina una extremidad en el parte superior de este montículo y el agregado apretado se inclina para producir la migración de la babosa (con la extremidad en el frente). La **babosa** (frecuentemente se le da el título más digno de **seudoplasmodio** o **grex –sanco–**) tiene generalmente 2-4 mm de longitud y está revestida por una cubierta mucilaginosa. El grex comienza a migrar (si el ambiente es oscuro y húmedo) con su extremo anterior levemente levantado. Cuando éste alcanza un área iluminada, la migración se detiene, y se producen las etapas de culminación del ciclo vital cuando el grex se diferencia en un cuerpo fructífero compuesto de células de esporas y un pie. Las células anteriores, representando el 15-20% de la población celular total, forman el pie tubular. Este proceso comienza cuando algunas de las células anteriores centrales, las células **precursoras del pie**, comienzan a formar una cubierta celulosa extracelular y extienden un tubo a lo largo del grex. Cuando las células precursoras del pie se diferencian, forman vacuolas y las agrandan, levantando encima la masa de células **precursoras de esporas** que compusieron el cuarto-quinto posterior del grex (Jermyn y Williams 1991). Las células del pie mueren, pero las células precursoras de esporas, elevadas sobre el pie, se convierten en células de esporas. Estas últimas se dispersan y llegan a ser cada una de ellas una nueva mixameba.

SITIO WEB 2-5 **Ciclo de vida del moho mucilaginoso (del fango o del limo) (Slime mold life cycle)**. Compruebe este sitio web para ver videos digitalizados sobre el ciclo de vida de *Dictyostelium*.

Además de su ciclo asexual, hay una posibilidad de sexualidad para *Dictyostelium*. Dos mixamebas pueden fusionarse para crear una célula gigante, que digiere a todas las otras células del agregado. Cuando se ha comido a todas sus vecinas, se enquista en sí misma en una gruesa pared y experimenta las divisiones meiótica y mitótica; finalmente, se liberan nuevas mixamebas.

Dictyostelium ha sido un organismo experimental maravilloso para los biólogos del desarrollo debido a que las células inicialmente idénticas se diferencian en dos tipos celulares alternativos: esporas y pie. Éste es también un organismo en el cual las células individuales se juntan para formar una estructura cohesiva compuesta de tipos celulares diferenciados, un proceso similar a la formación de tejidos en los organismos más complejos. La agregación de miles de mixamebas en un único organismo es una

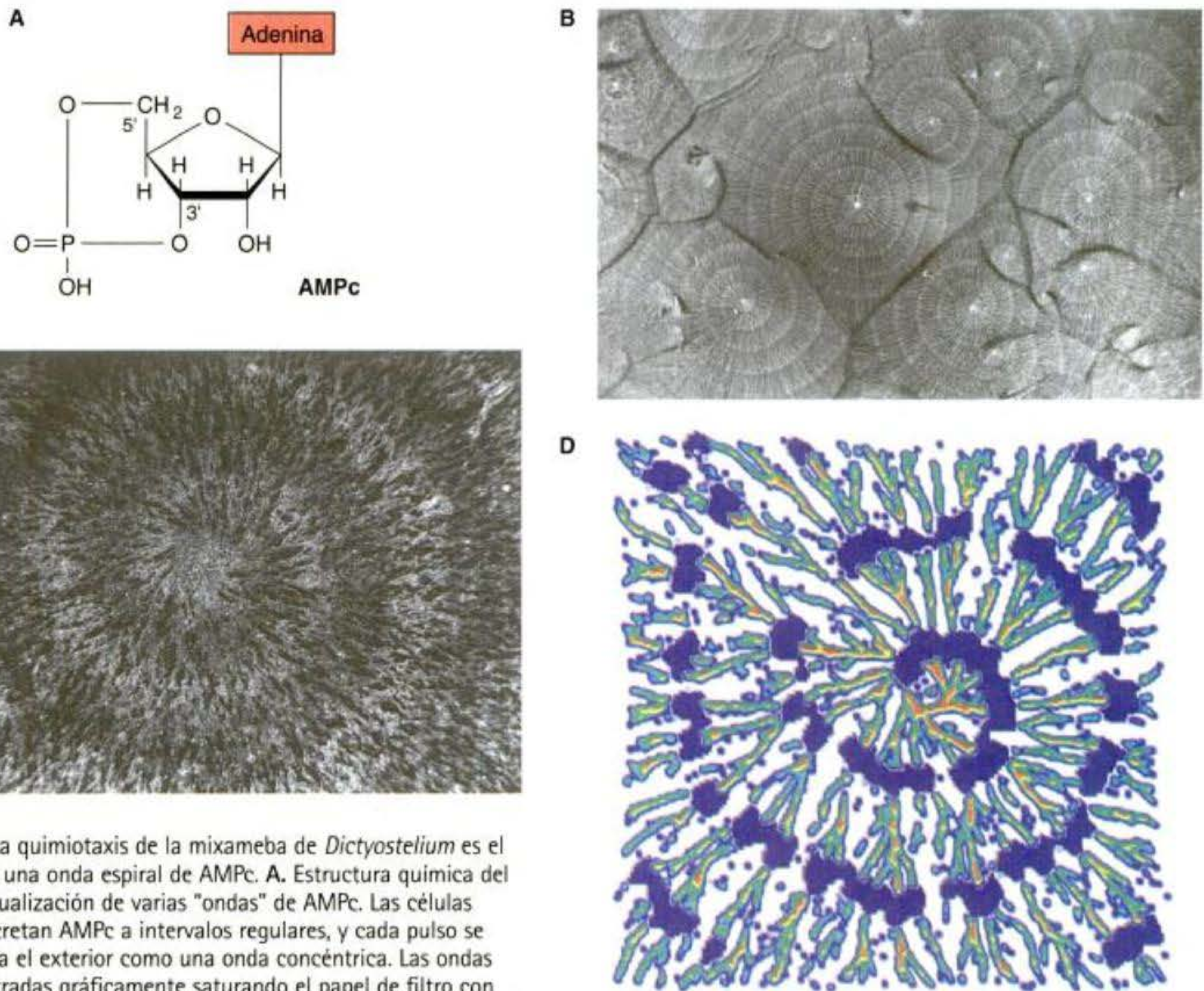


Fig. 2-17. La quimiotaxis de la mixameba de *Dictyostelium* es el resultado de una onda espiral de AMPc. **A.** Estructura química del AMPc. **B.** Visualización de varias "ondas" de AMPc. Las células centrales secretan AMPc a intervalos regulares, y cada pulso se difunde hacia el exterior como una onda concéntrica. Las ondas fueron registradas gráficamente saturando el papel de filtro con AMPc radiactivo y colocando a éste sobre una colonia en agregación. El AMPc a partir de las células que lo secretan diluye la radiactividad del AMPc. Cuando la radiactividad sobre el papel es registrada (al colocar a este sobre una película de rayos X), las regiones del cultivo con alta concentración de AMPc aparecen más claras que aquellas con baja concentración de AMPc. **C.** Ondas espirales de mixamebas moviéndose hacia la fuente inicial de AMPc. Debido a que las células en movimiento y aquellas que no lo están dispersan luz de modo diferente, la fotografía refleja el movimiento celular. Las bandas con mucha luz están compuestas de células en migración alargadas; las bandas oscuras son células que han dejado de moverse y se han redondeado. Cuando las células forman corrientes, todavía puede ser vista la espiral de movimiento desplazándose hacia el centro. **D.** Simulación por computadora de la onda de AMPc extendiéndose a lo largo de las células en migración de *Dictyostelium*. El modelo tiene en cuenta la recepción y liberación de AMPc, y los cambios en la densidad celular debidos al movimiento de las células. La onda de AMPc es trazada en azul oscuro. La población de amebas va desde el verde (bajo) hasta el rojo (alto). Compárese con el cultivo real mostrado en **(C)**. (**B** de Tomchick y Devreotes 1981; **C**, de Siegert y Weijer 1989; **D** de Dallon y Othmer 1997.)

hazaña increíble de organización que invita a la experimentación para responder preguntas acerca de los mecanismos involucrados.

> VADE MECUM[2] **Ciclo del vida del moho mucilaginoso (del fango o del limo) (Slime mold life cycle).** El ciclo de vida de *Dictyostelium* –la destacable agregación de las mixamebas, la migración de la babosa y la verdaderamente imponente culminación del pie y del cuerpo fructífero– se puede ver mejor mediante películas. El segmento del moho mucilaginoso contiene en Vade Mecum[2] una serie excepcional de videos. **[Hacer clic sobre Slime Mold]**

AGREGACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *DICTYOSTELIUM*. La primera de estas preguntas es, ¿qué causa el agregado de las mixamebas? La videomicroscopia en modo de lapso de tiempo *(time-lapse)* ha demostrado que no se producen movimientos dirigidos durante las primeras 4-5 horas que siguen a la carencia o necesidad de nutrientes. Sin embargo, durante las 5 horas siguientes las células pueden ser vistas moviéndose cerca de 20 mm/min por unos 100 segundos. Este movimiento cesa durante cerca de unos 4 minutos, luego se reanuda. Aunque el movimiento es dirigido hacia un punto central, no es un movimiento radial simple. En su lugar, las células se juntan entre sí para formar corrientes; las corrientes convergen en corrientes más grandes y finalmente todas las corrientes se fusionan en el centro. Bonner (1947) y Shaffer (1953) demostraron que este movimiento es el resultado de quimiotaxis: las células son guiadas hacia los centros de agregación por una sustancia soluble. Esta sustancia fue identificada posteriormente como **3´5´adenosina monofosfato cíclico (AMPc)** (Konijn y col. 1967; Bonner y col. 1969) y su estructura química se muestra en la figura 2-17A.

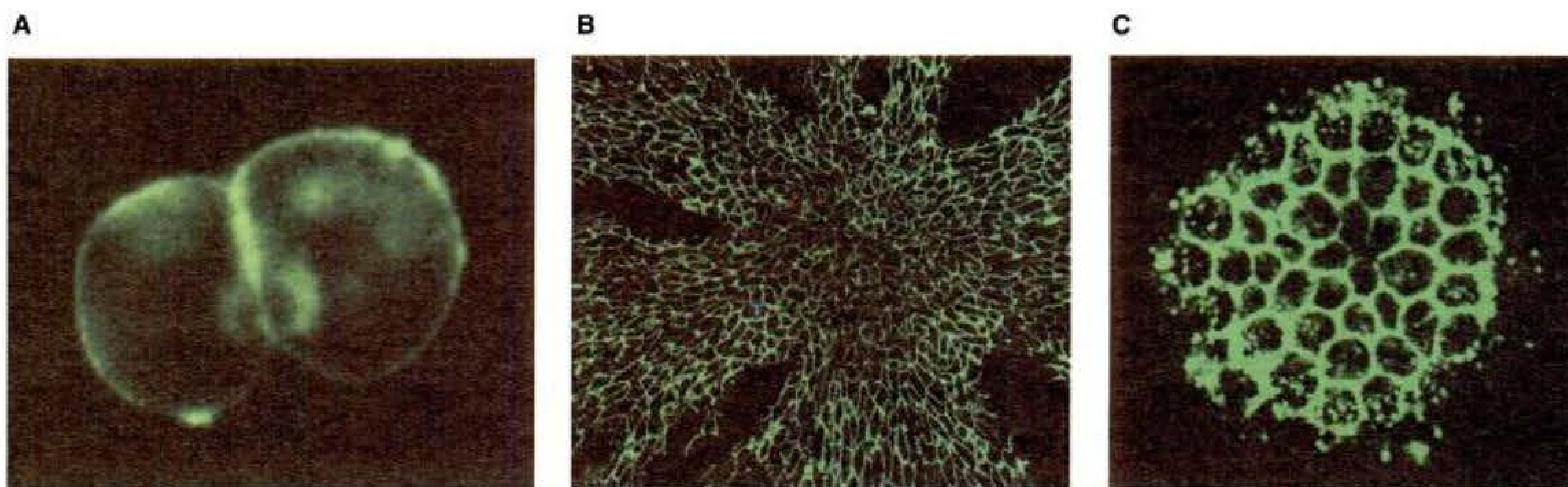


Fig. 2-18. Las tres moléculas de adhesión celular de *Dictyostelium*. **A.** Las células de *Dictyostelium* sintetizan una glucoproteína adhesiva de 24-kDa (gp24) poco después de la carencia de nutrientes. Estas células de *Dictyostelium* fueron teñidas con un anticuerpo marcado fluorescentemente (verde) que se une a la gp24 y luego fueron observadas bajo luz ultravioleta. Esta proteína no es observada en mixamebas que recién han dejado de dividirse. Sin embargo, como se muestra aquí -10 horas después que la división celular ha cesado- las mixamebas individuales tienen esta proteína en sus membranas celulares y son capaces de adherirse una con otra. **B.** La proteína gp80, teñida por anticuerpos específicos (verde), está presente en las membranas celulares de las corrientes de amebas. **C.** La proteína gp150 (verde) está presente en las células de grex en migración (seccionado transversalmente). Las fotografías no tienen el mismo aumento. (Fotografía cortesía de W. Loomis.)

La agregación se inicia cuando cada una de las mixamebas comienza a sintetizar AMPc. No hay células dominantes que comiencen la secreción o controlen a las otras. En su lugar, los sitios de agregación están determinados por la distribución de las mixamebas (Keller y Segal 1970; Tyson y Murray 1989). Las células vecinas responden al AMPc en dos sentidos: comienzan un movimiento hacia el pulso de AMPc, y luego ellas mismas liberan AMPc (Robertson y col. 1972; Shaffer 1975). Luego de que esto sucede, la célula es insensible a posteriores pulsos de AMPc por varios minutos. El resultado es una onda espiral de AMPc que rota propagándose a través de la población de células (fig. 2-17B-D). Cuando cada onda llega, las células dan otro paso hacia el centro.*

La diferenciación de mixamebas individuales en células del pie (somática) o de espora (reproductiva) es una cuestión compleja. Raper (1940) y Bonner (1957) demostraron que las células anteriores normalmente se convierten en pie, mientras que las restantes, las células posteriores están generalmente destinadas a formar esporas. Sin embargo, la eliminación quirúrgica de la parte anterior de la babosa no suprime su capacidad para formar un pie. En su lugar, las células que ahora se encuentran en el extremo anterior (y que originalmente estaban destinadas a producir esporas) forman el pie (Raper 1940). De algún modo se toman decisiones para que cualquiera de las células anteriores se convierta en las células del pie y que cualquiera de las células posteriores se conviertan en esporas. Esta capacidad de las células para cambiar su destino de desarrollo de acuerdo con su localización dentro del organismo entero y de este modo compensar las partes que faltan es denominada **regulación**. Observaremos este fenómeno en muchos embriones, incluidos los de mamíferos.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN *DICTYOSTELIUM*. ¿Cómo se adhieren las células individuales para formar juntas un organismo unido? Este problema es el mismo que el de las células embrionarias de la cara, y la solución que evolucionó en los protistas es la misma utilizada por los embriones: moléculas de adhesión celular reguladas para el desarrollo.

Mientras las células de *Dictyostelium* crecen mitóticamente sobre bacterias, no se adhieren entre sí. Sin embargo, una vez que la división celular se detiene, las células llegan a ser cada vez más adhesivas, alcanzando una meseta de máxima adherencia cerca de 8 horas luego de la carencia de nutrientes. La adhesión célula-célula inicial está mediada por una glucoproteína de 24-kilodalton (gp24) que está ausente en las mixamebas, pero que aparece poco después de finalizada la división mitótica (fig. 2-18A; Knecht y col. 1987; Wong y col. 1996). Esta proteína es sintetizada a partir de una nueva transcripción de mRNA y llega a estar localizada en las membranas celulares de las mixamebas. Si la mixameba es tratada con anticuerpos que unen y enmascaran a esta proteína, no se producirá la adhesión entre las células y finalmente se detendrá el desarrollo.

Una vez que se ha producido esta agregación inicial, es estabilizada por una segunda molécula de adhesión

* La bioquímica de esta reacción involucra a un receptor que une AMPc. Cuando se produce esta unión, tiene lugar la transcripción de genes específicos, es iniciado el movimiento hacia la fuente de AMPc y son activadas las enzimas que sintetizan AMPc a partir del ATP. El AMPc activa a los propios receptores de la célula así como aquellos de sus vecinas. Las células en el área se mantienen insensibles a nuevas ondas de AMPc hasta que el AMPc unido es quitado de los receptores por otra enzima de superficie celular, la fosfodiesterasa (Johnson y col. 1989). Las matemáticas de tales reacciones de oscilación (semejantes a las mostradas en la figura 1-20) predicen que la difusión de AMPc puede en principio ser circular. Sin embargo, como el AMPc interactúa con las células que reciben y propagan la señal, las células que reciben la parte frontal de la onda comienzan a migrar a diferentes velocidades que aquellas células situadas detrás de ellas (veáse Nanjundiah 1997, 1998). El resultado es la rotación en espiral de AMPc y la migración vista en la figura 2-17. Curiosamente, las mismas fórmulas matemáticas predicen la conducta de algunas reacciones químicas y la formación de nuevas estrellas en las galaxias rotando en espiral (Tyson y Murray 1989).

Información adicional y especulaciones

Reglas de la evidencia I

La biología, como cualquier otra ciencia, no trata con hechos, sino con evidencias. Varios tipos de evidencias serán presentados en este libro, y no tienen la misma fuerza. Como un ejemplo, se utilizará el análisis de la adhesión celular en *Dictyostelium*.

El primer tipo de evidencia, y la menos sólida, es la **evidencia correlativa**. Aquí, se observan correlaciones entre dos o más acontecimientos, y hay una inferencia de que un evento causa el otro. La evidencia correlativa proporciona un punto de partida para las investigaciones, pero no es posible decir con certeza que un evento causa al otro basado únicamente en correlaciones. Como hemos visto, anticuerpos marcados fluorescentemente para una cierta glucoproteína de 24-kDa (gp24) no se unen a las unión de las mixamebas en división, debido a que encuentran esta proteína en la membrana celular de mixamebas poco después de que las células detienen su división y llegan a ser competentes para agregarse (véase fig. 2-18A). Por lo tanto, hay una correlación positiva entre la presencia de esta glucoproteína de la membrana celular y la capacidad para agregarse.

Aunque se podría inferir que la síntesis de gp24 causa la adhesión de las células, también es posible que la adhesión celular lleve a las células a sintetizar esta glucoproteína, o que la adhesión celular y la síntesis de glucoproteína son eventos separados iniciados por la misma causa subyacente. La producción simultánea de estos dos eventos puede incluso ser una coincidencia, sin tener los eventos ninguna relación alguna entre sí.*

¿Cómo, entonces, se puede ir más allá de la mera correlación? En el estudio de la adhesión celular en *Dictyostelium*, la siguiente etapa fue el uso de anticuerpos que unen gp24 para bloquear la adhesión de las mixamebas. Utilizando una técnica desarrollada por primera vez por el laboratorio de Gerisch (Beug y col. 1970), Knetch y col. (1987) aislaron los sitios de unión de los anticuerpos al antígeno (las porciones de la molécula de anticuerpo que en realidad reconocen al antígeno). Esta etapa fue necesaria debido a que toda la molécula de anticuerpo contiene dos sitios de unión al antígeno y puede por esta razón hacer una reacción cruzada artificialmente y aglutinar mixamebas. Cuando estos fragmentos de unión al antígeno (denominados fragmentos Fab) fueron adicionados para la agregación de las células competentes, las células no se pudieron agregar. Los fragmentos inhiben la adhesión celular, presumiblemente por la unión a gp24 y el bloqueo de su función. Este tipo de evidencia es denominada **evidencia de pérdida de función**.

Mientras que es más fuerte que la evidencia correlativa, la evidencia de pérdida de función todavía no hace imposible otra inferencia. Por ejemplo, quizás los fragmentos de anticuerpo matan a las células directamente (como podría haber sido el caso si gp24 fuera un canal de transporte crítico); esto podría también detener la adherencia de las células. O tal vez gp24 no tiene relación alguna con la adhesión misma, pero es necesaria para que la molécula verdadera de adhesión pueda funcionar (quizás, por ejemplo, esto estabilice a las proteínas de membrana en general). En este caso, el bloqueo de las glucoproteínas puede del mismo modo causar la inhibición de la agregación celular. Por lo tanto, la evidencia de pérdida de función debe reforzarse por muchos controles que demuestren que los agentes que provocan la pérdida de función eliminan específicamente una función en particular y nada más.

El tipo de evidencia más fuerte es la **evidencia de ganancia de función**. Aquí, el comienzo del primer evento provoca que el segundo evento suceda incluso bajo circunstancias en donde ni incluso usualmente se produciría. Por ejemplo, da Silva y Klein (1990) y Faix y col. (1990) obtuvieron esta evidencia para demostrar que la glucoproteína de 80-kDa (gp80) es una molécula adhesiva en *Dictyostelium*. Aislaron al gen de gp80 y lo modificaron en un sentido que éste podía ser expresado todo el tiempo. Luego lo colocaron dentro de las mixamebas bien alimentadas, que generalmente no expresan esta proteína y usualmente no pueden adherirse entre sí. La presencia de esta proteína sobre la membrana de estas células en división fue confirmada mediante la marcación con anticuerpo. Además, las células tratadas ahora se adherían entre sí incluso en el estado proliferativo (cuando normalmente no lo hacen). Por lo tanto, han ganado función adhesiva únicamente por la expresión de esta glucoproteína específica sobre la superficie celular. Experimentos semejantes se han realizado recientemente sobre células de mamífero para demostrar la presencia de una molécula de adhesión específica en el embrión en desarrollo. Esta evidencia de ganancia de función es más convincente que los otros tipos de evidencia.

Esta evidencia de progresión "encontró esto; perdió esto; cambió esto" es la base de casi todos los estudios de los mecanismos de desarrollo (Adams 2000). A veces encontramos la progresión entera en un solo artículo científico, pero más a menudo, como en los casos antes representados, la evidencia proviene a partir de muchos laboratorios. Esta evidencia debe ser tomada en conjunto. "Cada científico, escribió Fleck (1979), sabe apenas lo poco que un experimento puede demostrar o puede convencer. Para establecer pruebas, son necesarios un sistema entero de experimentos y controles." La ciencia es un esfuerzo comunal, y es dudoso que un gran descubrimiento sea el logro de un único experimento, o de un solo individuo. La evidencia correlativa, de pérdida de función, y la de ganancia de función deben apoyarse consistentemente entre sí para establecer y solidificar una conclusión.

* En una carta en broma que se burla de las inferencias tan correlativas, Sies (1988) demostró una correlación notablemente buena entre el número de cigüeñas vistas en Alemania Occidental de 1965 a 1980 y el número de bebés nacidos durante esos mismos años.

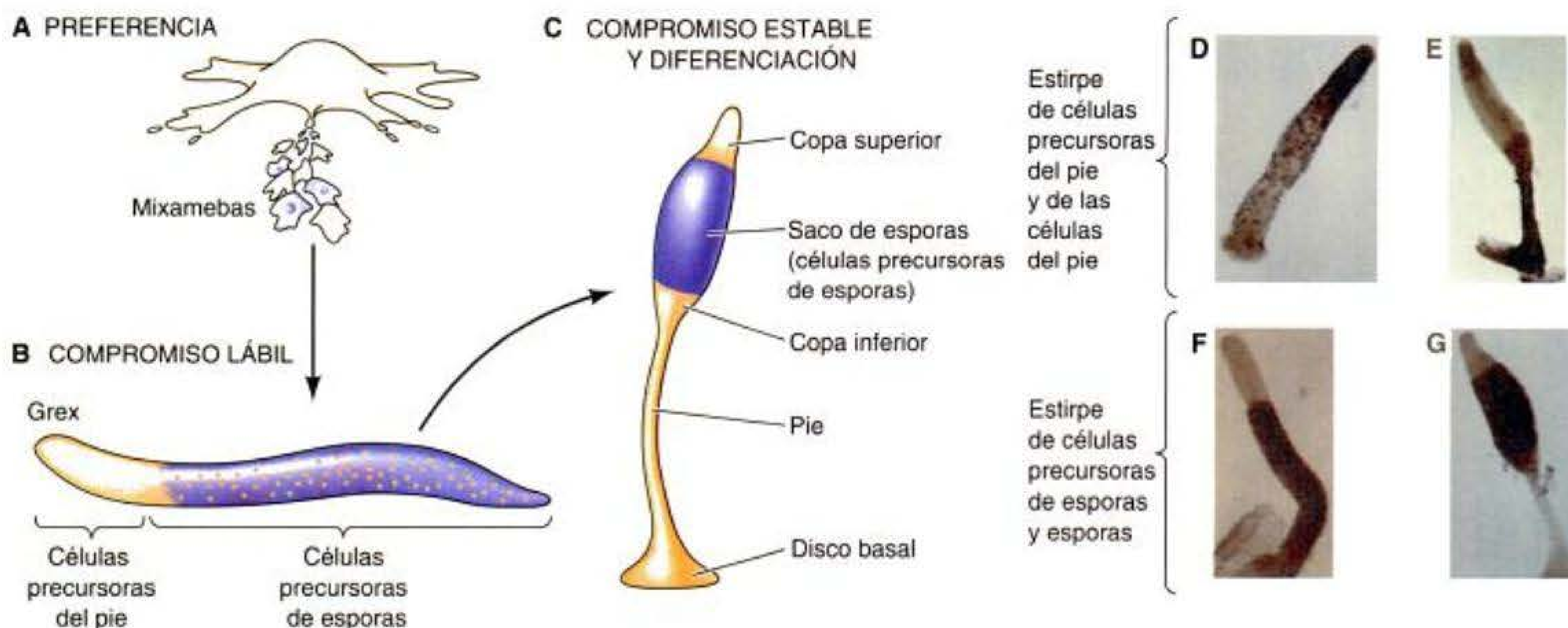


Fig. 2-19. Destinos celulares alternativos en *Dictyostelium discoideum.* **(A–C)** Compromiso progresivo de las células para llegar a ser esporas o células del pie. **A.** Las mixamebas pueden tener la preferencia hacia la formación de células del pie o de esporas debido a la etapa del ciclo en la que se encontraban cuando comenzó la carencia de nutrientes. **B.** Cuando el grex migra, la mayoría de las células precursoras del pie están en el tercio anterior del grex, mientras que la mayoría de los dos tercios posteriores son células precursoras de esporas. Algunas células precursoras del pie se observan también en los tercios posteriores, y estas células contribuirán a las copas del saco de esporas y al disco basal en el extremo inferior del pie. Sin embargo, los destinos celulares no están fijados, y si el tallo anterior en formación es cortado, las restantes células más anteriores se convertirán en el tronco del pie. **C.** En la culminación, las células formadoras de esporas son reunidas juntas en el saco de esporas. Las células del pie forman la copa del saco de esporas, así como el pie y la parte basal del disco. **D** y **E.** Grex y culminante teñido con un colorante que reconoce a la matriz extracelular de las células precursoras del pie y de las células del pie. **F** y **G.** Grex y culminante teñido con un colorante que reconoce a la matriz extracelular de las células precursoras de las esporas y a las esporas. (Según Escalante y Vicente 2000. Fotografías cortesía de R. Escalante.)

celular. Esta gucoproteína de 80-kDa (gp80) también se sintetiza durante la fase de agregación. Si ésta es defectuosa o está ausente en las células, se formarán babosas pequeñas y sus cuerpos fructíferos tendrán solo cerca de un tercio del tamaño normal. Por lo tanto, el segundo sistema de adhesión celular parece ser necesario para retener un número bastante grande de células como para formar cuerpos fructíferos grandes (Müller y Gerisch 1978; Loomis 1988). Durante la agregación tardía, disminuyen los niveles de gp80, y este papel es tomado por una tercera proteína de adhesión celular, una proteína de 150-kDa (gp150) cuya síntesis comienza a producirse justo previo a la agregación y que se mantiene sobre la superficie celular durante la migración del grex (Wang y col. 2000; fig. 2-18). Si las células de *Dictyostelium* carecen de genes funcionales para gp150, el desarrollo es detenido en el estado de agregación relajado, y las células precursoras de esporas y las células precursoras del pie no pueden segregarse en sus respectivas regiones.* Por esta razón, *Dictyostelium* ha evolucionado tres sistemas regulados en el desarrollo de la adhesión celular que son necesarios para la morfogénesis de las células individuales en un organismo coherente. Como veremos en los siguientes capítulos, las células de los metazoos también utilizan a las moléculas de adhesión celular para formar los tejidos y órganos del embrión.

Dictyostelium es un "organismo multicelular a tiempo parcial" que no da origen a muchos tipos celulares (Kay y col. 1989), y los organismos multicelulares más complejos no se forman por el agregado de células anteriormente independientes. No obstante, muchos de los principios de desarrollo demostrados por ese organismo "simple" aparecen también en los embriones de filos más complejos (véase Loomis e Insall 1999). La capacidad de las células individuales para percibir un gradiente químico (como en la respuesta de la mixameba al AMPc) es decisiva para la migración celular y la morfogénesis durante el desarrollo animal. Además, el papel de las proteínas de superficie celular en la cohesión celular se observa a lo largo del reino animal y las moléculas inductoras de diferenciación son ahora aisladas en organismos metazoos.

Diferenciación en Dictyostelium

La diferenciación en células del pie o de espora refleja otro fenómeno importante de la embriogénesis: la selección celular de un camino de desarrollo. Las células a menudo seleccionan un destino de desarrollo específico cuando las alternativas están disponibles.

* La proteína de adhesión celular gp150 de *Dictyostelium* puede ser crítica para la segregación de los precursores celulares de espora y de los precursores celulares del pie en el grex. Esta proteína se expresa primero en las células precursoras del pie y lleva a la segregación de las células precursoras de esporas. Unas pocas horas más tarde es también expresada en las células precursoras de esporas pero a un nivel menor. Si la proteína está ausente, no se produce segregación. Por lo tanto, parece ser que la diferencia temporal en la expresión y los niveles de expresión de esta proteína en los tipos celulares les permite segregarse (W. Loomis, comunicación personal).

Una célula particular en un embrión de vertebrado, por ejemplo, puede convertirse en una célula de la piel o en una neurona. En *Dictyostelium*, veremos una decisión dicotómica simple, debido a que son posibles solo dos tipos celulares. ¿Cómo es que una célula dada se convierte en célula del pie o en célula de espora? Parece ser un compromiso progresivo a uno de los dos caminos alternativos (fig. 2-19). Al principio hay una *preferencia* hacia uno u otro camino. Luego, se produce una *especificación lábil (inestable)*, un período en el que la célula llegará a ser normalmente una célula de espora o una célula de pie, pero en el que ésta todavía puede cambiar su destino si se la coloca en una posición diferente en el organismo. El tercero y cuarto estados son un *compromiso firme* para un destino específico, seguido de la *diferenciación* de la célula en un tipo celular particular, una célula de pie o una célula de espora.

PREFERENCIA. Aunque no se conocen completamente los detalles, el destino de la célula parece estar regulado por agentes internos y externos. En todas las mixamebas no se produce el mismo modo de agregación previa; pueden diferir en varios sentidos. Los factores internos que distinguen a las mixamebas individuales incluyen el estado nutricional, el tamaño de la célula, la fase del ciclo celular de carencias nutricionales y los niveles de calcio intracelular (Nanjundiah 1997; Azhar y col. 2001). Cada uno de estos factores puede actuar generando una preferencia de la célula hacia el camino de precursor celular de espora o de precursor celular de células del pie. Por ejemplo, las células con carencias nutricionales en las fases S y G2 temprana del ciclo celular tienen niveles relativamente altos de calcio y exhiben una tendencia a convertirse en células del pie, mientras que las células que tienen carencias nutricionales en G2 medio o tardío tienen bajos niveles de calcio y tienden a convertirse en células de espora.

ESPECIFICACIÓN LÁBIL. Varios factores externos son también importantes en la especificación en células del pie o en esporas. El amoníaco, un producto de la degradación de las proteínas, estimula la expresión de genes de células precursoras de espora y suprime la expresión de los genes que pueden llevar a la célula a convertirse en pie (Oyama y Blumberg 1986). Las células precursoras del pie pueden formarse solo cuando el amoníaco está agotado, y esto parece ocurrir por la difusión de amoníaco a la extremidad anterior levantada del grex. El AMP cíclico también puede funcionar para inducir la formación de células precursoras de esporas (Ginsburg y Kimmel 1997). Altas concentraciones de AMPc dan comienzo a la expresión de mRNA específicos de espora en los agregados de mixamebas. Además, cuando las babosas son colocadas en un medio que contiene una enzima que destruye el AMPc extracelular, las células precursoras de esporas pierden sus características diferenciadas (fig. 2-20; Schaap y van Driel 1985; Wang y col 1988a,b). Por lo tanto, el AMPc funciona como una señal extracelular (para quimiotaxis) y como una señal intracelular (para activar los genes responsables de la formación de esporas).

En el camino hacia células del pie, el calcio parece tener un papel crítico. Altos niveles de calcio parecen empujar a las células hacia la vía de células precursoras del pie, y el porcentaje de células del pie puede ser aumentado mediante la manipulación de la babosa para tener altos niveles de calcio (Cubitt y col. 1995; Jaffe 1997). Un lípido clorado secretado, DIF-1, también juega algún papel en la creación de células precursoras del pie, y éste puede inducir aquellos genes que producen matriz extracelular específica del pie. Estos dos factores pueden actuar sinérgicamente llevando a las células con altos niveles de calcio hacia el camino de células precursoras del pie.

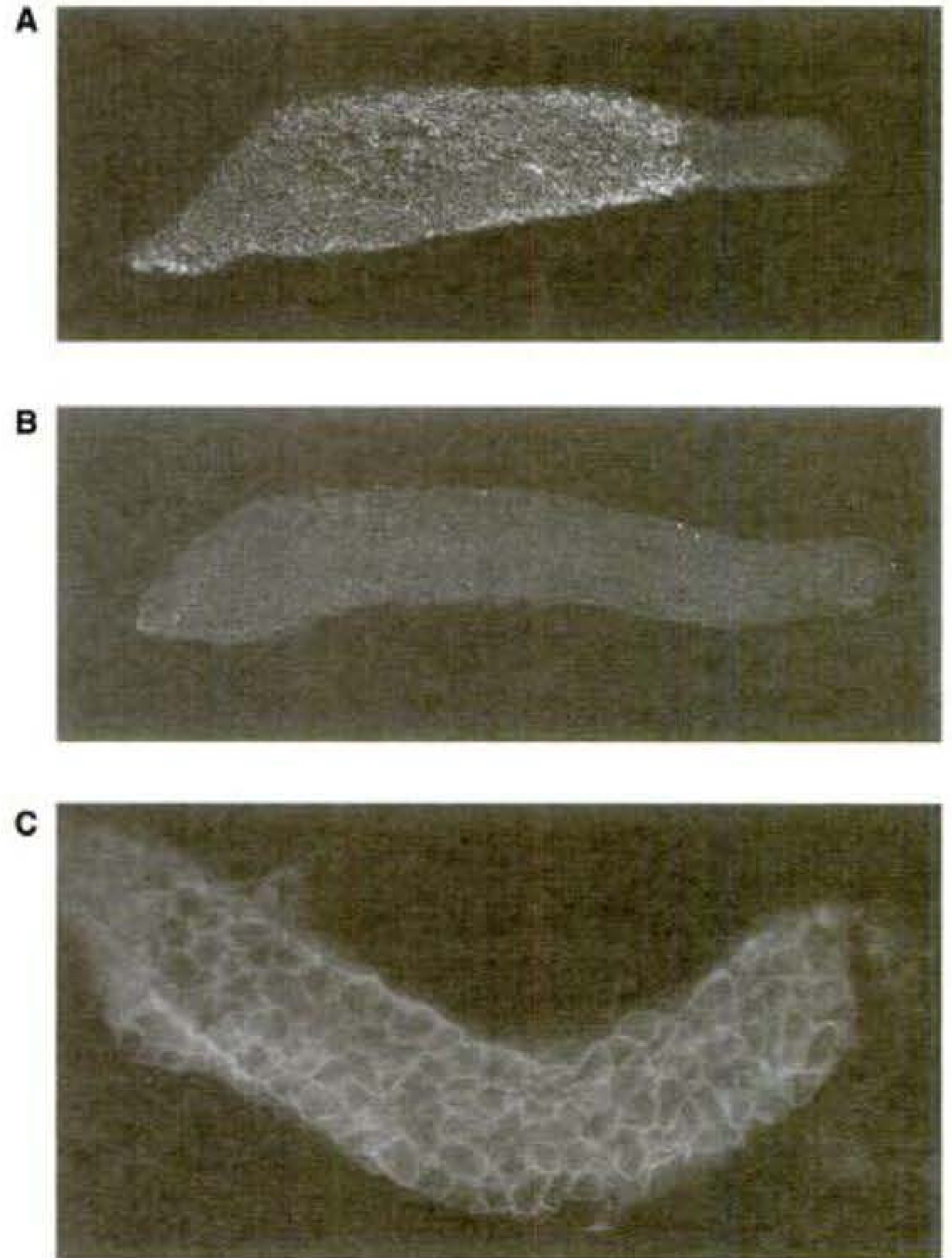


Fig. 2-20. Señales químicas que controlan la diferenciación en *Dictyostelium*. **(A. B)** Efectos al colocar un *Dictyostelium* grex en un medio con enzimas que destruyen el AMPc extracelular. **A.** Grex control teñido para la presencia de proteínas específicas de las células precursoras de esporas (regiones blancas). **B.** Grex similar teñido después de ser tratado con enzimas que degradan el AMPc. No se observan productos específicos de las células precursoras de esporas. **C.** Mayores aumentos de una babosa tratada con DIF (en ausencia de amoníaco). La tinción utilizada aquí se une a la pared de celulosa de las células del pie. (**A**,**B** de Wang y col., 1988a; **C** de Wang y Schaap, 1989; cortesía de los autores.)

COMPROMISO Y DIFERENCIACIÓN. Dos proteínas secretadas, los factores de diferenciación de esporas SDF1 y SDF2, parecen ser importantes en la diferenciación final de las células precursoras de esporas hacia esporas encapsuladas (Anjard y col. 1998a,b). SDF1 es importante para comenzar la culminación, mientras que SDF2 lleva a las células precursoras de esporas (pero no a las células precursoras del pie) a convertirse en esporas. Las células precursoras de esporas parecen

tener un receptor que les permite responder a SDF2, mientras que las células precursoras del pie carecen de este receptor (Wang y col. 1999). La formación de las células del pie a partir de las células precursoras del pie tiene una complicación semejante y podría involucrar a varios factores que funcionan sinérgicamente (Early 1999). La diferenciación de las células del pie parece necesitar una señal a partir de la enzima intracelular PKA, y al menos un tipo de célula del pie es inducida por el lípido DIF-1 (Thompson y Kay 2000; Fukuzawa y col. 2001).

Patrones de desarrollo entre los metazoos

Debido a que la mayor parte del resto de este libro concierne al desarrollo de los **metazoos** –animales pluricelulares* que pasan por estados embrionarios de desarrollo– se presentará una visión general de sus patrones de desarrollo. La figura 2-21 ilustra las principales tendencias evolutivas del desarrollo de los metazoos. El patrón más sorprendente es que la vida no ha evolucionado en una línea recta; en su lugar, hay varias ramificaciones de caminos evolutivos. Podemos ver que los metazoos pertenecen a una de tres ramas principales: diploblastos, protostomas y deuterostomas.

Las esponjas (poríferas) se desarrollan de un modo bastante diferente a cualquier otro grupo animal de modo tal que algunos taxonomistas no las consideran metazoos y las denominan "parazoos". Una esponja tiene tres tipos principales de células somáticas, pero una de éstas, el **arqueocito**, puede diferenciarse en todos los otros tipos celulares dentro del cuerpo. Células individuales de una esponja que pasan a través de un tamiz pueden reagregarse para formar nuevas esponjas. Además, en algunos casos, tal reagregación es específica de especie: si células de esponja individuales de dos especies diferentes son mezcladas juntas, cada una de las esponjas que se vuelve a formar contiene células de una sola especie (Wilson 1907). En estos casos, se piensa que los arqueocitos móviles recogen las células de su propia especie y no las de otras (Turner 1978). Las esponjas no contienen mesodermo, de modo tal que las poríferas no tienen un verdadero sistema de órganos, ni tampoco tienen un tubo digestivo, sistema circulatorio, nervios o músculos. Así, aunque pasan a través de un estado embrionario y uno larval, las esponjas son muy diferentes a la mayoría de los metazoos (Fell 1997). Sin embargo, las esponjas comparten muchas características de desarrollo (incluidas las proteínas reguladoras de genes y las cascadas de señales) con el resto del filo animal, sugiriendo que comparten un origen en común (Coutinho y col. 1998).

* Las plantas experimentan patrones de desarrollo embrionario y posembrionario fascinantes y de complejidad similar. Sin embargo, el desarrollo de las plantas difiere significativamente del de los animales, y se tomó la decisión de centrar este texto en el desarrollo de los animales. Los lectores que deseen descubrir algunas de las diferencias, están referidas en el capítulo 20, que proporciona una visión general del ciclo vital de las plantas y de los patrones de desarrollo de angiosperma (la planta de la semilla).

Diploblastos

Los animales **diploblásticos** son aquellos que tienen ectodermo y endodermo, pero no poseen un verdadero mesodermo. Los diploblastos incluyen a los cnidarios (medusa e hidras) y a los ctenóforos (portadores de peine o nueces de mar).

Los cnidarios y los ctenóforos constituyen la Radiada, así denominada porque tienen simetría radial, como la de un tubo o de una rueda. En estos animales, el mesodermo es rudimentario y consiste en células escasamente diseminadas en una matriz gelatinosa.

Protostomas y deuterostomas

La mayoría de los metazoos tiene simetría bilateral y tres capas germinales. La evolución del mesodermo les permitió mayor movilidad y el aumento del tamaño corporal porque se convirtió en la musculatura y sistema circulatorio del animal. Los animales de este filo son conocidos colectivamente como Bilateria. Todos los Bilateria deben haber descendido de un tipo primitivo de gusano plano. Estos gusanos planos fueron los primeros en tener un verdadero mesodermo (aunque no fue ahuecado hacia afuera para formar una cavidad del cuerpo), y pueden tener semejanzas con las larvas de ciertos celenterados (celentéreos) contemporáneos.

Los animales de Bilateria son clasificados posteriormente como protostomas o deuterostomas. Los **protostomas** (griego, "la boca primero"), que incluye los filos de los moluscos, artrópodos y gusanos, son llamados así debido a que durante la gastrulación la boca se forma primero, en o cerca de la apertura del intestino. El ano se forma más tarde en otra localización. El **celoma**, o cavidad corporal, de estos animales se forma del ahuecamiento hacia afuera de un cordón previamente sólido de células mesodérmicas. Hay dos ramas principales de protostomas. Los **ecdisozoos** que incluye a los animales que mudan su esqueleto exterior.* El principal constituyente de este grupo es el de los artrópodos, un filo que contiene insectos, arácnidos, ácaros, crustáceos y milpiés. El segundo grupo principal de los protostomas es el de **lofotrocozoos**. Estos animales están caracterizados por un tipo común de segmentación (espiral), una forma larval común (la trocófora) y un aparato de alimentación distintivo (lofóforo) encontrado en algunas especies. El filo de los lofotrocozoos incluye los gusanos planos, briozoos, anélidos y moluscos.

El filo en el linaje del **deuterostoma** incluye los cordados y equinodermos. Aunque puede parecer extraño clasificar a humanos, peces y ranas en el mismo grupo que estrellas de mar y erizos de mar, algunas características embriológicas apoyan este parentesco. En primer lugar, en los deuterostomas ("la boca después"), la apertura oral se forma después de la apertura anal. Además, mientras que los protostomas generalmente forman sus cavidades corporales por ahuecamiento hacia afuera de un bloque sólido de mesodermo

* El nombre ecdisozoo deriva del griego *ecdysis*, "para soltar" o "para hacerse libre de". Cuando se le pidió proporcionar una descripción más digna al trabajo de quien "se desviste" *(stripper)*, el editor H. L. Mencken sugirió el termino "ecdisista".

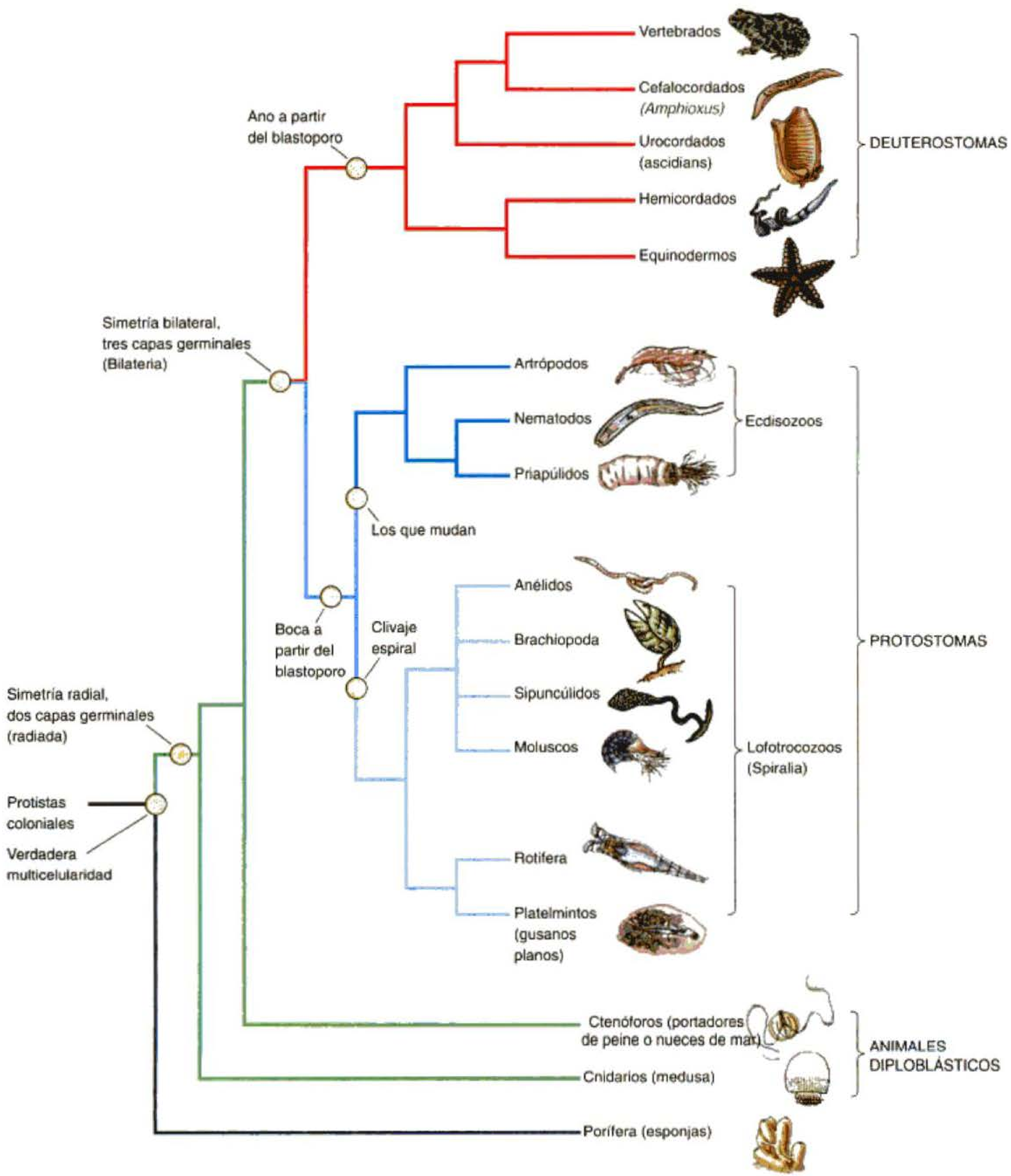


Fig. 2-21. Principales divergencias evolutivas en los animales existentes. Son posibles otros modelos de relaciones evolutivas entre los filos. Este grupo de metazoos está basado sobre criterios embriológicos, morfológicos y moleculares. (Basado en J. R. Garey, comunicación personal.)

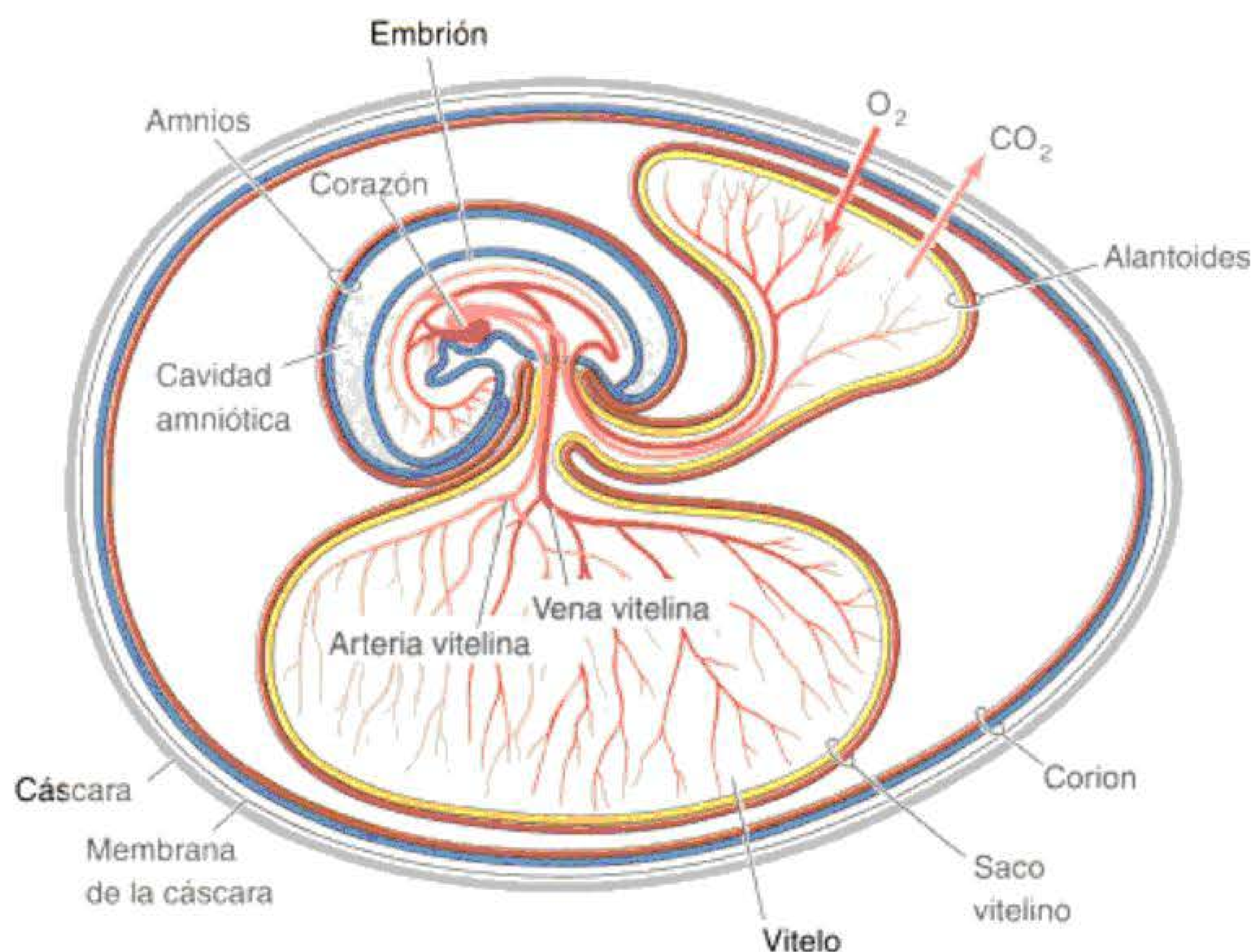


Fig. 2-22. Diagrama del huevo de amniota del pollo que muestra las membranas que envuelven al embrión de pollo de 7 días. El vitelo es finalmente rodeado por el saco vitelino, que permite la entrada de nutrientes hacia los vasos sanguíneos. El corion es derivado en parte del ectodermo y se extiende desde el embrión hacia la cubierta (donde éste se fusionará con los abundantes vasos sanguíneos del alantoides. Esta membrana corioalantoidea intercambiará oxígeno y dióxido de carbono y absorberá calcio de la cáscara). El amnios proporciona el medio fluido en el que el embrión crece y el alantoides recoge los desechos de nitrógeno que pueden ser peligrosos para el embrión. Finalmente el endodermo se convierte en el tubo digestivo y rodea el vitelo.

(formación **esquizocelómica** de la cavidad del cuerpo), la mayoría de los deuterostomas forma sus cavidades corporales a partir de bolsas mesodérmicas que se extienden desde el intestino (formación **enterocelómica** de la cavidad corporal). Debe mencionarse que hay muchas excepciones a estas generalizaciones.

La evolución de los organismos depende de los cambios heredados en su desarrollo. Uno de los grandes avances evolutivos –el **huevo de amniota**– se produce entre los deuterostomas. Este tipo de huevo, ejemplificado por el del pollo (fig. 2-22), se piensa que se originó en los ancestros anfibios de reptiles hace cerca de 255 millones de años. El huevo de amniota permitió a los vertebrados deambular por la tierra, lejos de las lagunas. Mientras que la mayoría de los anfibios debe retornar al agua para poner sus huevos, el huevo de amniota lleva su propia agua y abastecimiento alimentario. Éste es fecundado internamente y contiene vitelo para nutrir el embrión en desarrollo. Además, el huevo de amniota contiene cuatro sacos: el **saco vitelino**, que almacena proteínas nutritivas; el **amniótico**, que contiene el fluido que baña al embrión; el **alantoides**, en el que se colectan los materiales de desecho del metabolismo del embrión y el **corion**, que interactúa con el ambiente externo, permitiendo a los materiales alcanzar selectivamente el embrión.* La estructura entera es recubierta por una cáscara que permite la difusión de oxígeno pero es lo suficientemente dura como para proteger al embrión de las agresiones ambientales y de la deshidratación. Un desarrollo similar de las cubiertas del huevo permitió a los artrópodos ser los primeros invertebrados terrestres. Así, el cruce final del límite entre el agua y la tierra se produjo con la modificación de los estados más tempranos en el desarrollo: el huevo.

* En los mamíferos, el corion es modificado para formar la porción embrionaria de la placenta; otro ejemplo de la modificación del desarrollo para producir cambios evolutivos.

VADE MECUM[2] **El huevo de amniota (The amniote egg).** El huevo del pollo, según lo detallado en esta secuencia, es un ejemplo hermoso y fácilmente accesible del huevo del amniota; una adaptación sorprendente a la vida terrestre.
[Hacer clic sobre Chick-early]

La embriología proporciona una interminable colección de animales fascinantes y de problemas para estudiar. En este texto, se utilizará tan solo una pequeña muestra de ellos para representar los principios más importantes del desarrollo animal. Esta muestra es una colección increíblemente pequeña. Estamos observando simplemente una piscina pequeña de marea dentro de nuestro alcance, mientras que el océano entero de fenómenos de desarrollo yace ante nosotros.

Después de una breve reseña de las aproximaciones experimental y genética para la biología del desarrollo, se investigarán los estados tempranos de la embriogénesis

animal: fecundación, segmentación, gastrulación y el establecimiento de los ejes corporales. En los capítulos posteriores nos concentraremos en los mecanismos genéticos y celulares por el que el cuerpo animal es construido. Aunque se ha hecho una tentativa de examinar las variaciones importantes a través del reino animal, cierto chovinismo hacia el deuterostoma puede ser evidente. (Para un análisis más comprensivo de la diversidad del desarrollo animal a través del filo, véase Gilbert y Raunio 1997.)

Principios de desarrollo: ciclos de vida y patrones de desarrollo

1. El ciclo de vida puede considerarse una unidad central en biología. La forma del adulto no necesita ser primordial. En un sentido, el ciclo de vida es el organismo.
2. El ciclo vital básico consiste de fecundación, segmentación, gastrulación, formación de las capas germinales, organogénesis, metamorfosis, adultez y senescencia.
3. La reproducción y el sexo son dos procesos separados que pueden pero no necesariamente se dan juntos. Algunos organismos, como *Volvox* y *Dictyostelium*, exhiben reproducción asexual y reproducción sexual.
4. La segmentación divide al cigoto en numerosas células denominadas blastómeras.
5. En el desarrollo animal, la gastrulación reorganiza a las blastómeras y forma las tres capas germinales.
6. La organogénesis a menudo involucra interacciones entre capas germinales para producir distintos órganos.
7. Las células germinales son los precursores de los gametos. La gametogénesis forma los espermatozoides y el huevo.
8. Hay tres caminos principales para proporcionar nutrición al embrión en desarrollo: 1) suministrar al embrión con vitelo, 2) formar un estado larval alimentario entre el embrión y el adulto; o 3) crear una placenta entre la madre y el embrión.
9. Los ciclos vitales deben estar adaptados a los ambientes sin vida y entrelazarse con otros ciclos vitales.
10. No se produce la regresión de su cola hasta que usted ha formado sus extremidades posteriores.
11. Hay varios tipos de evidencia. La correlación entre el fenómeno A y el fenómeno B no implica que A causa B o que B causa A. Datos de pérdida de función (si A es quitado experimentalmente, B no se produce) sugieren que A causa B, pero otras explicaciones son posibles. Datos de ganancia de función (si sucede A donde o cuando éste no ocurre normalmente, entonces B también sucede en este nuevo tiempo o lugar) es más convincente.
12. Los protostomas y deuterostomas representan dos grupos diferentes de variaciones sobre el desarrollo. Los protostomas forman primero la boca, mientras que los deuterostomas forman su boca más tarde, usualmente forman primero el ano.

Bibliografía citada

Adams, D. 2003. Teaching critical thinking in a developmental biology course at an American liberal arts college. Int. J. Dev. Biol. 47: 145-151.

Anjard, C., W. T. Chang, J. Gross and W. Nellen. 1998a. Production and activity of spore differentiation factors (SDFs) in Dictyostelium. Development 125: 4067-4075.

Anjard, C., C. Zeng, W. P. Loomis and W. Nellen. 1998b. Signal transduction pathways leading to spore differentiation in Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 193: 146-155.

Azhar, M., P. K. Kennady, G. Pande, M. Espiritu W. Holloman, D. Brazill, R. H. Gomer and V. Nanjundiah. 2001.,Cell cyde phase, cellular Ca^{2+} and development in Dictyostelium discoideum. Int. J. Dev Biol. 45: 405-414.

Beck, S. D. 1980. Insect Photoperiodism, 2nd Ed. Academic Press, New York.

Bergman, K., U. W. Goodenough, D. A. Goodenough, J. Jawitz and H. Martin. 1975. Gametic differentiation in Chlamydomonas reinhardtii. II. Flagellar membranes and the agglutination reaction. J. Cell Biol. 67: 606-622.

Beug, H., G. Gerisch, S. Kempff, V. Riedel and G. Cremer. 1970. Specific inhibition of celi contact formation in Dictyostelium by univalent antibodies. Exp. Cell. Res. 63: 147-158.

Bonner, J. T.1947. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. J. Exp. Zool. 106: 1-26.

Bonner, J. T. 1957. A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds. Q. Rev. Biol. 32: 232-246.

Bonner, J. T. 1965. Size and Cycle. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Bonner, J. T., D. S. Berkley, E. M. Hall, T. M. Konijn, J. W. Mason, G. O'Keefe and P. B. Wolfe. 1969. Acrasin, acrasinase, and the sensitivity to acrasin in Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 20: 72-87.

Coutinho, C., J. Seack, G. de Vyler, R. Borojevic and W. E. G. Muller. 1998.

Origin of the metazoan body plan: Characterization and functional testing of the promoter of the homeobox gene EmH-3 from the freshwater sponge Ephydatia muelleri in mouse 3T3 cells. Biol. Chem. 379: 1243-1251.

Cubitt, A. B., R. A. Firtel, G. Fischer, L. F. Jaffe and A. L. MilleL 1995. Patterns of free caicium in multicellular stages of Dictyostelium expressing jellyfish apoaequorin. Development. 121: 2291-2301.

Dallon, J. C. and H. G. Othmer. 1997. A discrete cell model with adaptive signalling for aggregation of Dictyostelium discoideum. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. [B] 352: 391-417.

da Silva, A. M. and C. Klein. 1990. Cell adhesion transformed D. discoideum cells: Expression of gp80 and its biochemical characterization. Dev. Biol. 140: 139-148.

Dumais, J., K. Serikawa and D. F. Mandoli. 2000. Acetabularia: A unicellular model for understanding subcellular localization and morphogenesis during development. J. Plant Growth Reg. 19: 253-264.

Early, A. 1999. Signalling pathways that direct prestalk and stalk cell differentiation in Dictyostelium. Sem. Cell Dev. Biol. 10: 587-595.

Escalante, R. and J. J. Vicente. 2000. Dictyostelium discoideum: A model system for differentiation and patterning. Int. J. Dev. Biol. 44: 819-835.

Faix, J., G. Gerisch and A. A. Noegel. 1990. Constitutive overexpression of the contact A glycoprotein enables growth-phase cells of Dictyostelium discoideum to aggregate. EMBO J. 9: 2709-2716.

Fell, P. E. 1997. Porifera: The sponges. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 39-54.

Fleck, L. 1979. Genesis and Development of a Scientific Fact. Translated by F. Bradley and T. J. Trenn. University of Chicago Press, Chicago.

Fukuzawa, M., T. Araki, J. Adrian and J. G. Williams. 2001. Tyrosine phosphorylation-in-dependent nuclear translocation of a Dictyostelium STAT in response to DIF signaling. Mol. Cell 7: 779-788.

Garcia, E. and A.-C. Dazy. 1986. Spatial distribution of poly(A)+ RNA and protein synthesis in Acetabularia mediterranea. Biol. Cell 58: 23-29.

Gilbert, S. F. and A. M. Raunio (eds.). 1997. Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Ginsburg, G. T. and A. R. Kimmel. 1997. Autonomous and nonautonomous regulation of axis formation by antagonistic signaling via 7-span cAMP receptors and GSK3 in Dictyostelium. Genes Dev. 11: 2112-2123.

Goodenough, U. W. and R. L. Weiss. 1975. Gametic differentiation in Chlamydomonas reinhardtii. III. Cell wall lysis and microfilament associated mating structure activation in wild-type and mutant strains. J. Cell Biol. 67: 623-637.

Hallmann, A., P. Amon, K. Godl, M. Heitzer and M. Sumper. 2001. Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: A new gene family from Volvox encoding modular proteins with (hydroxy)proline-rich and metalloproteinase homology domains. Plant J. 26: 583-593.

Hammerling, J. 1934. Über formbildended Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre raumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux Arch. Entwicklung-smech. Org. 131: 1-82.

Jaffe, L. F. 1997. The role of calcium in pattern formation. In Y. Maeda, K. Inouye and I. Takeuchi (eds.), Dictyostelium: A Model System for Cell and Developmental Biology. Universal Academy Press, Tokyo, pp. 267-277.

Jermyn, K. A. and J. Williams. 1991. An analysis of culmination in Dictyostelium using prestalk and stalk-specific cell autonomous markers. Development 111: 779-787.

Johnson, R. L. and 7 others. 1989. G-protein-linked signal transduction systems control development in Dictyostelium. Development [Suppl.]: 75-81.

Kay, R. R., M. Berks and D. Traynor. 1989. Morphogen hunting in Dictyostelium. Development [Suppl.]: 81-90.

Keller, E. F. and L. A. Segal. 1970. Initiation of slime mold aggregation viewed as an instability. J. Theor. Biol. 26: 399-415.

Kirk, D. L.1988. The ontogeny and phylogeny of cellular differentiation in Volvox. Trends Genet. 4: 32-36.

Kirk, D. L. 1999. Evolution of multicellularity in the Volvocine lineage. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 496-501.

Kirk, D. L. 2000. Volvox as a model system for studying the ontogeny and phylogeny of multicellularity and cell differentiation. J. Plant Growth Reg. 19: 265-274.

Kirk, D. L. 2001a. Germ-soma differentiation in Volvox. Dev. Biol. 238: 213-223.

Kirk, D. L. 2001b. Cover photo, November 1, 2001. Dev. Biol. 239(1).

Kirk, D. L. and M. M. Kirk. 1986. Heat shock elicits production of sexual inducer in Volvox. Science 231: 51-54.

Kirk, D. L., G. I. Viamontes, K. J. Green and J. L. Bryant, Jr. 1982. Integrated morphogenetic behavior of cell sheets: Volvox as a model. In S. Subtelny and P. B. Green (eds.), Developmental Order: Its Origin and Regulation. Alan R. Liss, New York, pp. 247-274.

Kloppstech, K. and H. G. Schweiger. 1975. Polyadenylated RNA from Acetabularia. Differentiation 4: 115-123.

Knecht, D. A., D. Fuller and W. F. Loomis. 1987. Surface glycoprotein gp24 involved in early adhesion of Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 121: 277-283.

Konijn, T. M., J. G. Van De Meene, J. T. Bonner and D. S. Barkley. 1967. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 1152-1154.

Krutch, J. W. 1956. The Great Chain of Life. Houghton Mifflin, Boston.

Loomis, W. F. 1988. Cell-cell adhesion in Dictyostelium discoideum. Dw. Genet. 9: 549-559.

Loomis, W. F. and R. H. Insall. 1999. A cell for all seasons. Nature 401: 440-441.

Mandoli, D. F. 1998. What ever happened to Acetabularia? Bringing a once-classic model system into the age of molecular genetics. Int. Rev. Cytol. 182: 17.

Müller, K. and G. Gerisch. 1978. A specific glycoprotein as the target of adhesion blocking Fab in aggregating Dictyostelium cells. Nature 274: 445-447.

Nanjundiah, V. 1997. Models for pattern formation in the dictyostelid slime molds. In Y. Maeda, K. Inouye and I. Takeuchi (eds.), Dictyostelium: A Model System for Cell and Developmental Biology. Universal Academy Press, Tokyo, pp. 30322.

Nanjundiah, V. 1998. Cyclic AMP oscillations in Dictyostelium discoideum: Models and observations. Biophys. Chem. 72: 1-8

Neumann, D. and K.-D. Spindler. 1991. Circasemilunar control of imaginal disc development in Clunio marinus: Temporal switching point, temperature-compensated developmental time, and ecdysteroid profile. J. Insect Physiol. 37: 101-109.

Oyama, M. and D. D. Blumberg. 1986. Cyclic AMP and NH3/NH4+ both regulate cell-type-specific mRNA accumulation in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 117: 557-566.

Pan, J. and W. J. Snell. 2000. Signal transduction during fertilization in the unicellular green alga Chlamydomonas. Curr. Opin. Microbiol. 3: 596-602.

Pommerville, J. and G. Kochert. 1982. Effects of senescence on somatic cell physiology in the green alga Volvox carteri. Exp. Cell. Res. 14: 39-45.

Powers, J. H. 1908. Further studies on Volvox with description of three new species Trans. Am. Micros. Soc. 28: 141-175.

Raper, K. B. 1940. Pseudoplasmodium formation and organization in Dictyostelium discoideum. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 56: 241-282.

Robertson, A., D. . Drage and M. H. Cohen. 1972. Control of aggregation in Dictyostelium discoideum by an external periodic pulse of cyclic adenosine monophosphate. Science 175: 333-335.

Rugh, R. 1950. The Frog Its Reproduction and Development. McGraw-Hill, New York.

Schaap, P. and R. van Driel. 1985. The induction of post-aggregative differentiation in Dictyostelium discoideum by cAMP. Evidence for involvement of the cell surface cAMP receptor. Exp. Cell. Res. 159: 388-398.

Serikawa, K. A., D. M. Porterfield, and D. F. Mandoli. 2001. Asymmetric subcellular mRNA distribution correlates with carbonic anhydrase activity in Acetabularia acetabulum. Plant Physiol. 125:900-911.

Shaffer, B. M.1953. Aggregation in cellular slime molds: In vitro isolation of acrasin. Nature 171: 975.

Shaffer, B. M. 1975. Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. Nature 255: 549-552.

Siegert, F. and C. r. Weijer. 1989. Digital image processing of optical density wave propagation in Dictyostelium discoideum and analysis of the effects of caffeine and ammonia. J. Cell Sci. 93: 325-335.

Sies, H. 1988. A new parameter for sex education. Nature 332:495.

Strickberger, M. W. 1985. Genetics, 3rd. Ed,. Macmillan, New York.

Sumper, M., E. Berg, S. Wenzl and K. Godl.1993. How a sex pheromone might act at a concentration below 10^{-16} M. EMBO J. 12: 831-836.

Thompson, C. R. L. and R. R. Kay. 2000. The role of DIF-I signaling in Dictyostelium development. Mol. Cell 6: 1509-1514.

Tomchick, K. J. and P. N. Devreotes.1981. Adenosine 3',5' monophosphate waves in Dictyostelium discoideum. Science 212: 443-446.

Turner, R. S., r. 1978. Sponge cell adhesions. In D. R. Garrod (ed.), Specificity of Embryological Interactions. Chapman and Hall, London, pp. 199-232.

Tyson, J. . and J. D. Murray. 1989. Cyclic AMP waves during aggregation of Dictyostelium amoebae. Development 106: 421-426.

Wang, J., L. Hou, D. Awrey, W. F. Loomis, R. A. Firtel and C.-H. Siu. 2000. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the lagC gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during Dictyostelium development. Dev. Biol. 227: 734-745.

Wang, M. R. and P. Schaap. 1989. Ammonia depletion and DIF trigger stalk cell differentiation in intact Dictyostelium discoideum. Development 105: 569-574.

Wang, M. R., R. J. Aerts, W. Spek and P. Schaap. 1988a. Cell cycle phase in Dictyostelium discoideum is correlated with the expression of cyclic AMP production, detection and degradation: Involvement of cAMP signaling in cell sorting. Dev. Biol. 125: 410-416.

Wang, M. R., R. van Driel and P. Schaap. 1988b. Cyclic AMP-phosphodiesterase induces dedifferentiation of prespore cells in Dictyostelium discoideum slugs: Evidence that cyclic AMP is the morphogenetic signal for prespore differentiation. Development 103: 611-618.

Wang, N., F. Soderbom, C. Anjard, G. Shaulsky and W. F. Loomis. 1999. SDF-2 induction of terminal differentiation in Dictyostelium discoideum is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. Mol. Cell. Biol. 19: 4750-4756.

Wilson, E. B. 1896. The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson, H. V. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool. 5: 245-258.

Wilson, N. F., M. . Foglesong and W. J. Snell. 1997. The Chlamydomonas mating type plus fertilization tubule, a prototypic cell fusion organelle: Isolation, characterization, and in vitro adhesion to mating type minus gametes. J. Cell Biol. 137: 1537-1553.

Wong, E. F. S., S. K. Brar, H. Sesaki, C. Yang and C.-H. Siu. 1996. Molecular cloning and characterization of DdCAD-I, a calcium-dependent cell-cell adhesion molecule, in Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem. 2271: 16399-16408.

Capítulo 3 Principios de embriología experimental

Es posible, yo pienso, por medio de la experimentación solamente, determinar qué tan lejos y en qué sentido podemos continuar la investigación de las causas de la forma.
THOMAS HUNT MORGAN (1898)

El comportamiento de una célula en un embrión depende del grado con el que ésta escucha a su madre o a su vecindad. El tamaño y la naturaleza del ruido, el modo en el que éste es oído y la respuesta son imprevisibles y solo pueden descubrirse a través de la experimentación.
JONATHAN BARD (1997)

LA EMBRIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y LA EMBRIOLOGÍA EVOLUTIVA TIENEN SUS RAÍCES EN LA ANATOMÍA. Sin embargo, a finales del siglo XIX, la nueva ciencia biológica de la fisiología hizo incursiones en la investigación embriológica. Las preguntas del "¿qué?" se convirtieron en preguntas del "¿cómo?" Una nueva generación de embriólogos sentía que la embriología no debía ser meramente una guía para el estudio de la anatomía y de la evolución, sino que debía responder a la pregunta, "¿cómo una célula huevo llega a ser un adulto?" Los embriólogos fueron impulsados a estudiar los mecanismos de formación (morfogénesis) y diferenciación de órganos. Este nuevo programa fue denominado *Entwicklungsmechanik*, traducido con frecuencia como "embriología causal", "embriología fisiológica" o "mecánica del desarrollo". Su objetivo era encontrar las moléculas y procesos que causaban los cambios visibles en el embrión. La experimentación debía complementar la observación en el estudio de los embriones, y se esperaba que los embriólogos descubrieran las propiedades del embrión viendo cómo las células embrionarias respondían a las perturbaciones y a las alteraciones. Wilhem Roux (1894), uno de los fundadores de esta rama de la embriología, la vio como una magnífica tarea:

> *No nos debemos el hecho de que la investigación causal de un organismo es uno de los más difíciles, sino el más difícil de los problemas que el intelecto humano ha intentado resolver... debido a que cada nueva causa comprobada solo da origen a nuevas preguntas con respecto a la causa de esta causa.*

En este capítulo, se discutirán tres de los principales programas de investigación en embriología experimental. El primero se interesa en cómo las fuerzas externas del embrión influyen en el desarrollo. El segundo se interesa en cómo las fuerzas internas del embrión causan la diferenciación de las células. El tercero examina cómo las células se autoordenan en tejidos y órganos.

SITIO WEB 3.1 **Establecimiento de la embriología experimental (Establishing experimental embryology).** La fundación de la *Entwicklungsmechanik* fue llevada a cabo por un grupo de jóvenes investigadores que deseaban una aproximación más fisiológica a la embriología. Estos científicos estaban en desacuerdo acerca de los mecanismos del desarrollo, pero cooperaron para asegurarse lugares para realizar y publicar sus investigaciones.

Biología del desarrollo ambiental

El embrión en desarrollo no está aislado de su ambiente. En numerosos ejemplos, las señales ambientales son una parte fundamental del ciclo de vida de los organismos. Además, se puede alterar el desarrollo quitando o modificando estos parámetros ambientales.

Determinación del sexo mediada por el ambiente

DETERMINACIÓN DEL SEXO EN UN GUSANO EQUIÚRIDO (GUSANO CUCHARA): BONELLIA. Cuando se formuló por primera vez el campo de la mecánica del desarrollo, algunas de las variables obvias para manipular fueron la temperatura y el medio en el que se desarrollaban los embriones. Estos estudios tempranos dieron comienzo a numerosos programas experimentales sobre los efectos del ambiente en el desarrollo. Por ejemplo, Baltzer (1914) demostró que el sexo del gusano equiúrido *Bonellia viridis* dependía del sitio en el que era depositada la larva. El gusano hembra de *Bonellia* es un animal marino, que vive en las rocas, con un cuerpo de una longitud cercana a los 10 cm (fig. 3-1); tiene una probóscide que puede extenderse hasta un metro de longitud. El macho *Bonellia*, sin embargo, tiene una longitud de tan solo 1-3 mm y reside dentro del útero de la hembra, fecundando a sus huevos. Baltzer mostró que si la larva de *Bonellia* se deposita en el fondo del mar, se convierte en hembra. Sin embargo, una larva puede meterse en la probóscide de la hembra (que aparentemente emite señales químicas que atraen a las larvas), entra por la boca de la hembra, migra hacia su útero y se diferencia en macho. Por esta razón, si la larva se sitúa sobre el fondo marino, se convierte en hembra; si ésta se deposita sobre una probóscide, se convierte en macho. Baltzer (1914) y Leutert (1974) pudieron duplicar este fenómeno en el laboratorio incubando larvas en ausencia o presencia de hembras adultas (fig. 3-2).

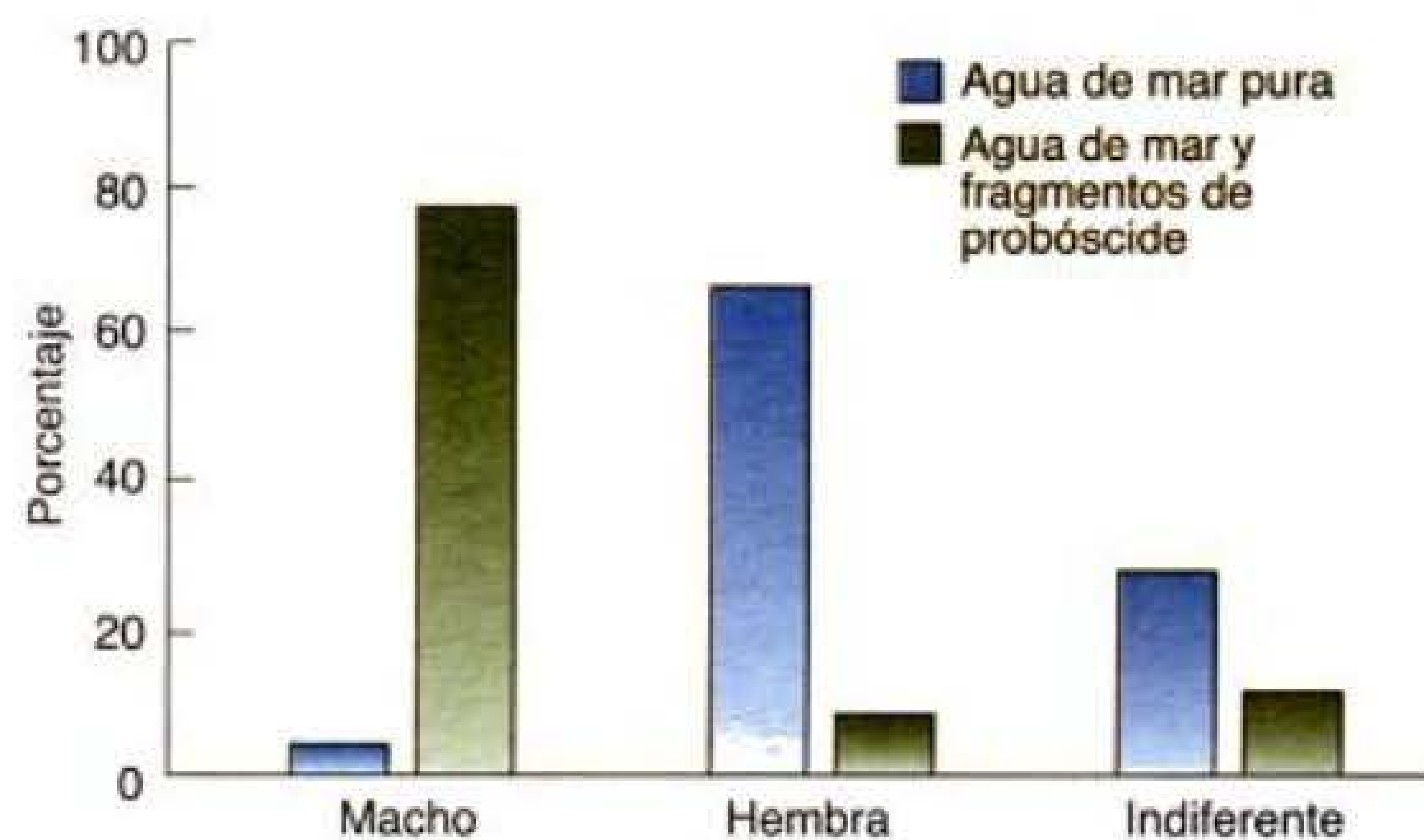


Fig. 3-2. Análisis in vitro de la determinación sexual de *Bonellia*. Larvas de *Bonellia* fueron colocadas en agua de mar normal o agua de mar que contenía fragmentos de probóscides femeninas. La mayoría parte de los animales cultivados ante la presencia de fragmentos de probóscides se convertía en machos, mientras que en su ausencia, la mayoría parte llegaba a ser hembras. (Según Leutert 1974.)

DETERMINACIÓN DEL SEXO EN UN VERTEBRADO: CAIMÁN (ALLIGATOR). Los efectos del ambiente sobre el desarrollo pueden tener importantes consecuencias. Las investigaciones recientes han mostrado que el sexo de los caimanes, cocodrilos y muchos otros reptiles no depende únicamente de los cromosomas, sino además de la temperatura. Ferguson y Joanen (1982), luego de estudiar la determinación del sexo de *Mississippi alligator* (caimán) en su ambiente natural y en el laboratorio, concluyeron que el sexo es determinado por la temperatura del huevo durante la segunda y tercera semanas de incubación. Los huevos incubados durante ese período a 30ºC o por debajo, producen caimanes hembras, mientras que aquellos huevos incubados a 34ºC o por encima, producen caimanes machos. (A 32ºC, el 87% de los que nacían eran hembras.) Por otra parte, en tanto que los nidos se construyan sobre pantanos húmedos (cercanos a 30ºC) se generan hembras; en nidos construidos sobre diques (cercanos a 34ºC) se originan machos. Estos hallazgos son obviamente importantes para los encargados de cuidar la fauna y para los granjeros que desean criar esta especie. También dan origen a preguntas sobre política ambiental, debido a que la sombra de las edificaciones o el calor de los efluentes termales pueden tener efectos impresionantes sobre las proporciones sexuales entre los reptiles. Posteriormente, en el capítulo 17, se discutirá el mecanismo de determinación del sexo dependiente de la temperatura.

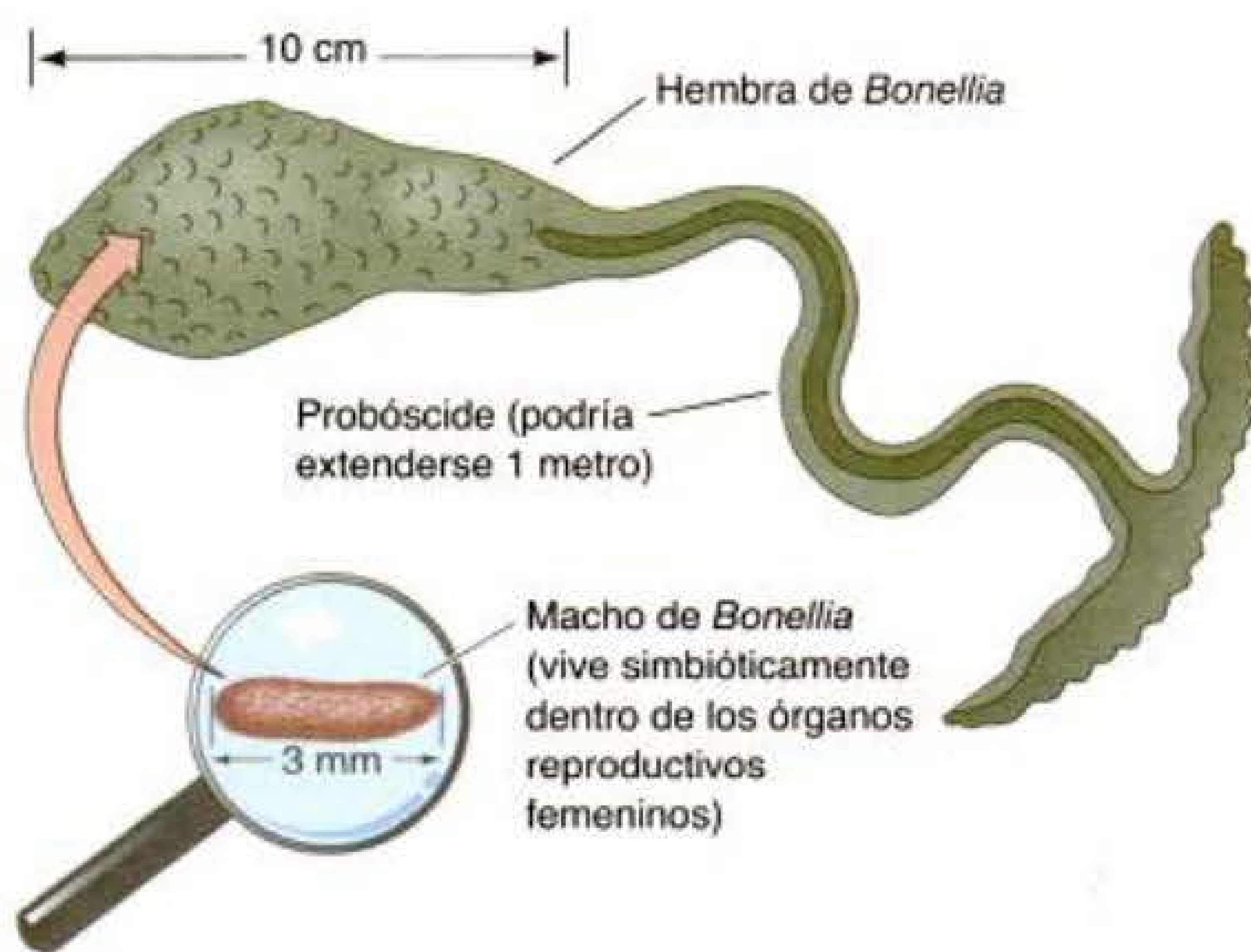


Fig. 3-1. Dimorfismo sexual en *Bonellia viridis*. El cuerpo de una hembra madura tiene cerca de 10 cm de longitud, pero su probóscide puede extenderse hasta un metro. El cuerpo del macho simbiótico es muy pequeño, de 1-3 mm de longitud. Mientras que el cuerpo de una hembra adulta es enterrado en los sedimentos del océano, su probóscide se extiende fuera de los sedimentos, donde puede usarse para alimentación o para atraer larvas.

> SITIO WEB 3.2 **Los riesgos de la determinación sexual dependiente del ambiente (The hazards of environmental sex determination).** Ferguson y Joanen (1982) especularon que la determinación del sexo dependiente de la temperatura pudo haber sido responsable de la extinción de los dinosaurios. En nuestra actual era de cambios climáticos la dependencia de la temperatura para la determinación del sexo puede también ser peligrosa para las especies de reptiles.

Adaptaciones de embriones y larvas a sus ambientes

PLASTICIDAD FENOTÍPICA. Otro programa de biología del desarrollo ambiental se interesa en cómo se adaptan los embriones a su ambiente específico. August Weismann (1875) fue el primero en estudiar las adaptaciones larvales,

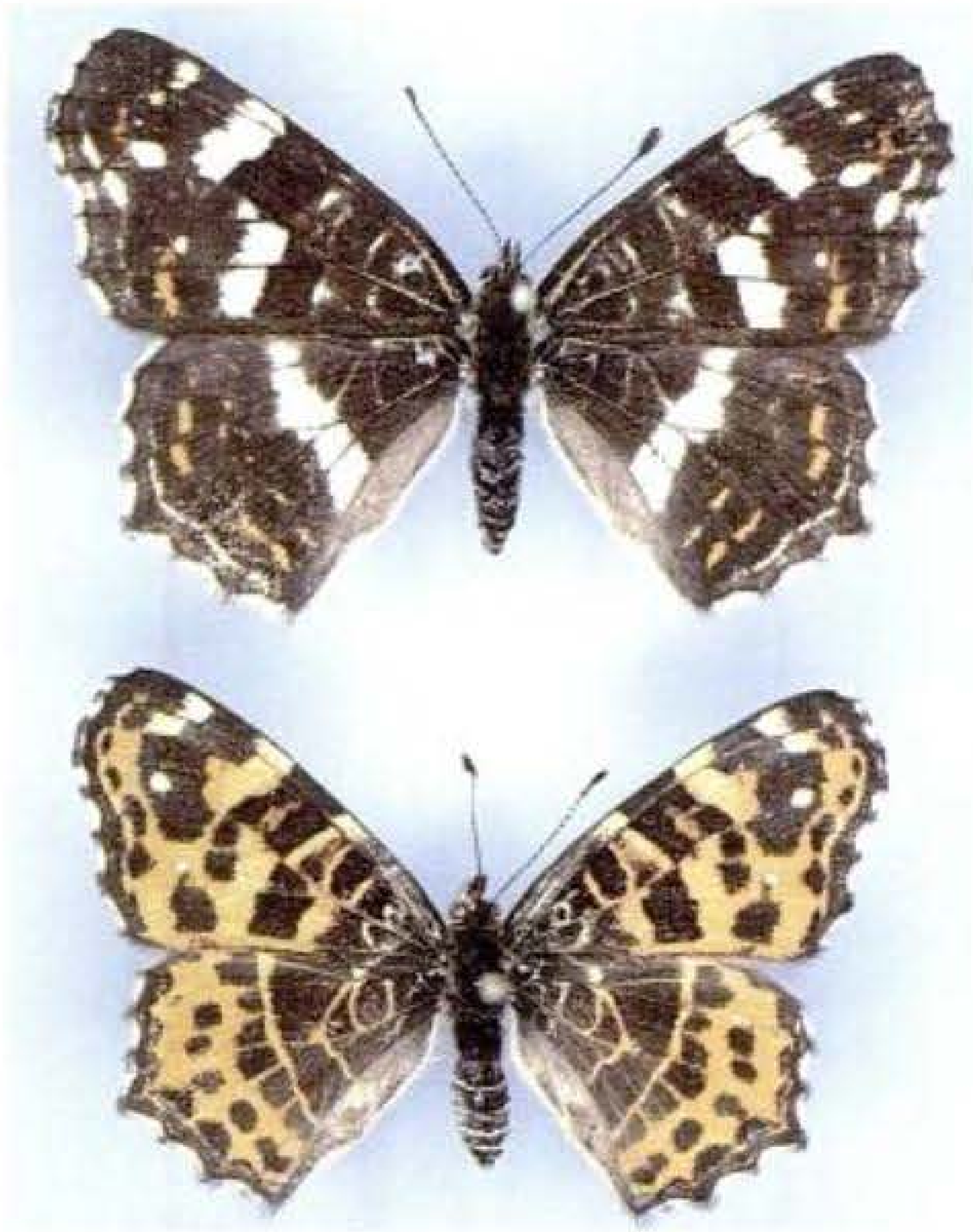


Fig. 3-3. Dos morfos de *Araschnia levana*, la mariposa mapa europea. El morfo de verano es representado en el extremo superior, el morfo de primavera en el extremo inferior. En estas especies, las diferencias de fenotipo son provocadas por diferencias en la duración del día y de temperatura durante el periodo larval. (Fotografías cortesía de H. F. Nijhout.)

y las investigaciones recientes en esta área han proporcionado algunas revelaciones fascinantes de cómo se produce el desarrollo de un organismo en respuesta a su ambiente. Weismann observó que las mariposas que nacían durante las distintas estaciones presentaban colores diferente, y que esta coloración estación-dependiente podía imitarse al incubar larvas a diferentes temperaturas. Las variantes fenotípicas que resultan a partir de diferencias ambientales se denominan a menudo **morfos**. Un ejemplo de tales variaciones estacionales es la mariposa mapa europea, *Araschnia levana*, que tiene dos fenotipos estacionales bastante diferentes que Linnaeus clasificó como dos especies diferentes (van der Weele 1995). El morfo de primavera es de color naranja brillante con manchas negras, mientras que el morfo de verano es principalmente negro con una banda blanco (fig. 3-3). El cambio de el morfo de primavera al de verano está controlado por variaciones tanto de la duración de la luz del día como de la temperatura durante el período larval. Cuando los investigadores imitan experimentalmente las condiciones de primavera, las orugas de verano pueden dar origen a mariposas de "primavera" (véase fig. 22-10; Koch and Buchmann 1987; Nijhout 1991).

Otro ejemplo espectacular de cambio estacional en el desarrollo se produce en la polilla *Nemoria arizonaria*. Esta polilla tiene un ciclo de vida bastante típico de insecto. Los huevos eclosionan en primavera y las orugas se alimentan de flores de robles jóvenes (amentos). La metamorfosis de estas larvas se produce a fines de la primavera, se aparean en el verano y ponen huevos en los árboles de roble, produciendo otra camada de orugas. Estas orugas se alimentan de hojas de roble, metamorfosean y se aparean. Sus huevos pasan el invierno para comenzar el ciclo otra vez en la próxima primavera. Lo destacable es que las orugas que eclosionan en primavera no se parecen en nada a sus progenies que nacen en verano (fig. 3-4). Las orugas que eclosionan en primavera y se alimentan de amentos de roble (flores) son amarillo-marrones, rugosas, con aspecto de cuentas de collar y pareciéndose nada más que a un amento de roble, están espléndidamente camufladas contra los depredadores. ¿Pero qué de las orugas que eclosionan en verano, después de que todos los amentos se han ido? Ellas, también, están muy bien camufladas, pareciéndose a ramitas de roble. ¿Qué controla esta diferencia? Haciendo experimentos de alimentación recíprocos, Greene (1989) pudo convertir orugas de primavera en morfos de verano al alimentarlas con hojas de roble. El experimento

A



B



Fig. 3-4. Dos morfos de *Nemoria arizonaria*. **A.** Las orugas que eclosionan en la primavera se alimentan de amentos de roble y desarrollan una cutícula que se parece a la de las flores. **B.** Las orugas que eclosionan en verano (después de que los amentos se han ido) se alimentan de hojas de roble. Estas orugas desarrollan una cutícula que se parece a las ramitas jóvenes de roble. (Fotografía cortesía de E. Greene.)

recíproco no permitió transformar a los morfos de verano en orugas parecidas a un amento. Por lo tanto, parece ser que las formas de amento constituyen el estado "por defecto" y que algo induce la morfología tipo ramita. Algo que probablemente sea un tanino que se concentra en las hojas de roble a medida que éstas maduran.

Los embriólogos han puesto de relieve que lo que es heredado no es un genotipo determinista, sino un genotipo que codifica una variedad potencial de fenotipos. El ambiente a menudo es permisivo para seleccionar el fenotipo que se adapta a esa estación o hábitat. La variedad continua de fenotipos expresados por un solo genotipo a través de una variedad de condiciones ambientales es denominada la **norma de reacción** (el estándar) (Woltereck 1909; Schmalhausen 1949; Stearns y col. 1991; Schlichting y Pigliucci 1998).

LA PROTECCIÓN DEL HUEVO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA. La supervivencia de los embriones en sus ambientes representa desafíos de enormes proporciones. En efecto, como Darwin observó claramente, la mayoría de los huevos y de los embriones no llegan a sobrevivir. Un erizo de mar puede poner decenas de miles de huevos en el agua de mar, pero solo uno o dos de los embriones resultantes llegarán a ser un erizo adulto. La mayor parte se convierte en comida para otros organismos. Además, si el ambiente cambia, la supervivencia del embrión podría aumentar o disminuir de manera espectacular. Por ejemplo, muchos huevos y embriones tempranos están en contacto directo con la luz del sol por largos períodos. Si pasáramos varias horas bajo el sol sin pantalla solar, conseguiríamos una quemadura de los rayos ultravioletas; esta radiación UV es peligrosa para nuestro DNA. Entonces ¿cómo hacen los huevos para sobrevivir a todas aquellas horas de constante exposición al sol (a menudo en la misma playa donde nos asoleamos)?

En primer lugar, parece que muchos huevos han desarrollado pantallas solares naturales. Los huevos de muchos organismos marinos contienen altas concentraciones de pigmentos aminoácidos parecidos a la micosporina, que absorben la radiación ultravioleta (UV-B). Además, tal como nuestro pigmento melanina, estos pigmentos pueden ser inducidos por exposición a radiación UV-B (Jokiel y York 1982; Siebeck 1988). Los huevos de tunicados son muy resistentes a la radiación UV-B, y gran parte de esta resistencia se debe a su cubierta extracelular que está enriquecida con componentes de micosporina (Mead y Epel 1995). Adams y Shick (1996; 2001) manipularon experimentalmente en el huevo del erizo de mar una concentración de aminoácidos tipo micosporina y encontraron que los embriones de huevos que tenían mayor cantidad de estos componentes estaban mejor protegidos de los daños de UV que los embriones que tenían una menor cantidad. Por otra parte, cuando un huevo deficiente en micosporina era expuesto a radiación ultravioleta, se observaban anomalías del desarrollo significativas (fig. 3-5). Así, estos aminoácidos tipo micosporina parecen desempeñar un papel importante en la protección del erizo de mar en desarrollo contra las radiaciones ultravioletas.

	Luz UV-filtrada	Luz UV-filtrada + UV-A y UV-B
Blástula temprana	A	D
Gástrula	B	E
Larva plútea	C	F

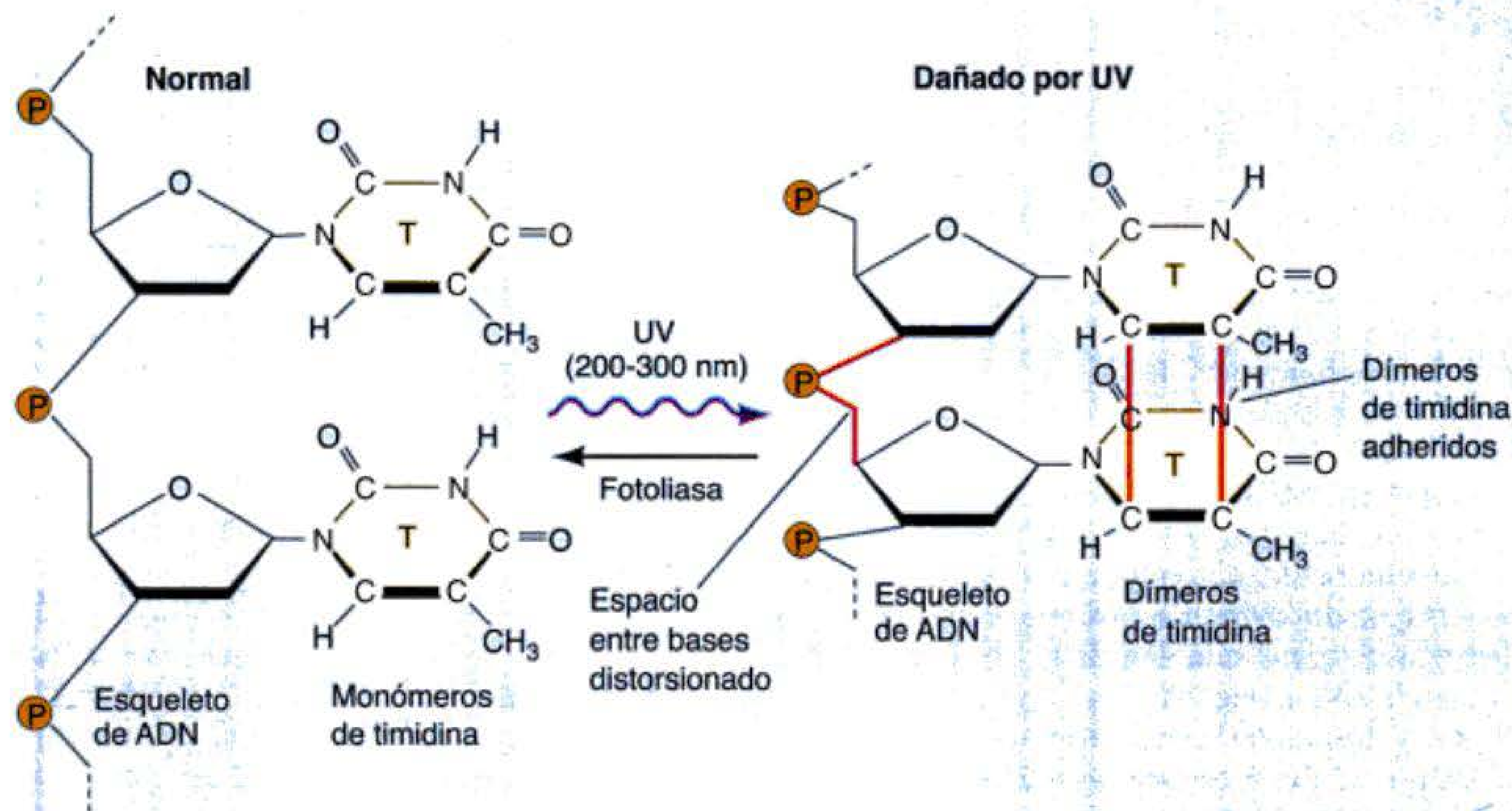
Fig. 3-5. Efecto de la radiación ultravioleta (UV) en embriones de erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis*. Los huevos fueron fecundados y colocados en agua de mar carentes de fuentes de aminoácidos tipo micosporina. La primera columna (A–C) representa el crecimiento de embriones sin la presencia de radiación ultravioleta. La segunda columna (D–F) muestra el mismo estado de crecimiento embrionario ante la presencia de luz filtrada, pero con radiación ultravioleta agregada. Las cabezas de flecha en "s" muestran espículas esqueléticas aisladas. (De Adams y Shick 2001; fotografías cortesía de los autores.)

VADE MECUM[2] **Erizos de mar y radiación UV (Sea urchins and UV radiation).** Esta sección presenta datos que documentan la protección del erizo de mar por aminoácidos parecidos a la micosporina. Este tipo de investigación relaciona a la biología del desarrollo con la ecología y la biología de conservación. **[Hacer clic sobre Sea Urchin-UV]**

Es posible que la exposición aumentada de UV-B pueda ser un factor importante en la disminución de los embriones de anfibio observada en todo el mundo en las últimas dos décadas. Poblaciones de anfibios en

Cuadro 3-1. *Actividad de fotoliasa correlacionada con la exposición de los huevos a la radiación ultravioleta en 10 especies de anfibios*

Especies	*Actividad de fotoliasa*[a]	*Modo de depositar el huevo*	*Exposición a la luz del sol*
Plethodon dunni	<0,1	Huevos ocultos	Ninguna
Xenopus laevis	0,1	Huevos puestos en el laboratorio[b]	Limitada
Triturus granulosa	0,2	Huevos ocultos	Limitada
Rana variegatus	0,3	Huevos ocultos	Ninguna
Plethodon vehiculum	0,5	Huevos ocultos	Ninguna
Ambystoma macrodactylum	0,8	Huevos a menudo puestos en aguas abiertas	Alguna
Ambystoma gracile	1,0	Huevos a menudo puestos en aguas abiertas	Alguna
Bufo boreas	1,3	Huevos puestos a menudo en aguas poco profundas abiertas	Alta
Rana cascadae	2,4	Huevos puestos en aguas poco profundas abiertas	Alta
Hyla regilla	7,5	Huevos puestos en aguas poco profundas abiertas	Alta



Fuente: Según Blaustein y col. 1994.
[a] Actividad específica de fotoliasa, 1.011 dímeros de timidina separados por hora por mg. Los valores son promedio de 6-8 ensayos.
[b] En la naturaleza, los huevos de *Xenopus laevis* se pusieron bajo la vegetación con exposición limitada a la luz del sol.

localizaciones extensamente dispersas han sido drásticamente reducidas en las últimas dos décadas, y algunas de estas especies (como el sapo dorado de Costa Rica) se han llegado a extinguir recientemente (Phillips 1994). Blaustein col. (1994) han examinado los niveles de fotoliasa, una enzima que repara los daños de UV en el DNA de huevos de anfibios y ovocitos, mediante la eliminación y el reemplazo de residuos de timidina dañada. Los niveles de fotoliasa variaron unas 80 veces entre las especies examinadas, y estuvieron correlacionados con el sitio en el que el huevo se encontraba. Los huevos más expuestos al sol tenían altos niveles de fotoliasa (cuadro 3-1). Estos niveles también están correlacionados con el hecho de si la especie está sufriendo una disminución en su población o no la está sufriendo. Los niveles altos de fotoliasa fueron encontrados en aquellas especies (como la rana de árbol del Pacífico, *Hyla regilla*) cuyas poblaciones no estaban en declinación. Los niveles bajos fueron observados en aquellas especies (como el sapo del oeste, *Bufo boreas*, y la rana de cascada, *Rana cascadae*) cuyas poblaciones habían disminuido espectacularmente.

Blaustein y col. examinaron si la radiación UV-B podía ser un factor en la disminución del porcentaje de nacimientos de huevos de anfibios. Dividieron a los huevos de cada una de las tres especies de anfibios en tres grupos y los situaron en dos sitios del campo (fig. 3-6). El primer grupo se desarrolló sin ningún filtro solar. El segundo grupo se desarrolló bajo un filtro que permitía el paso de las UV-B. El tercer grupo se desarrolló bajo un

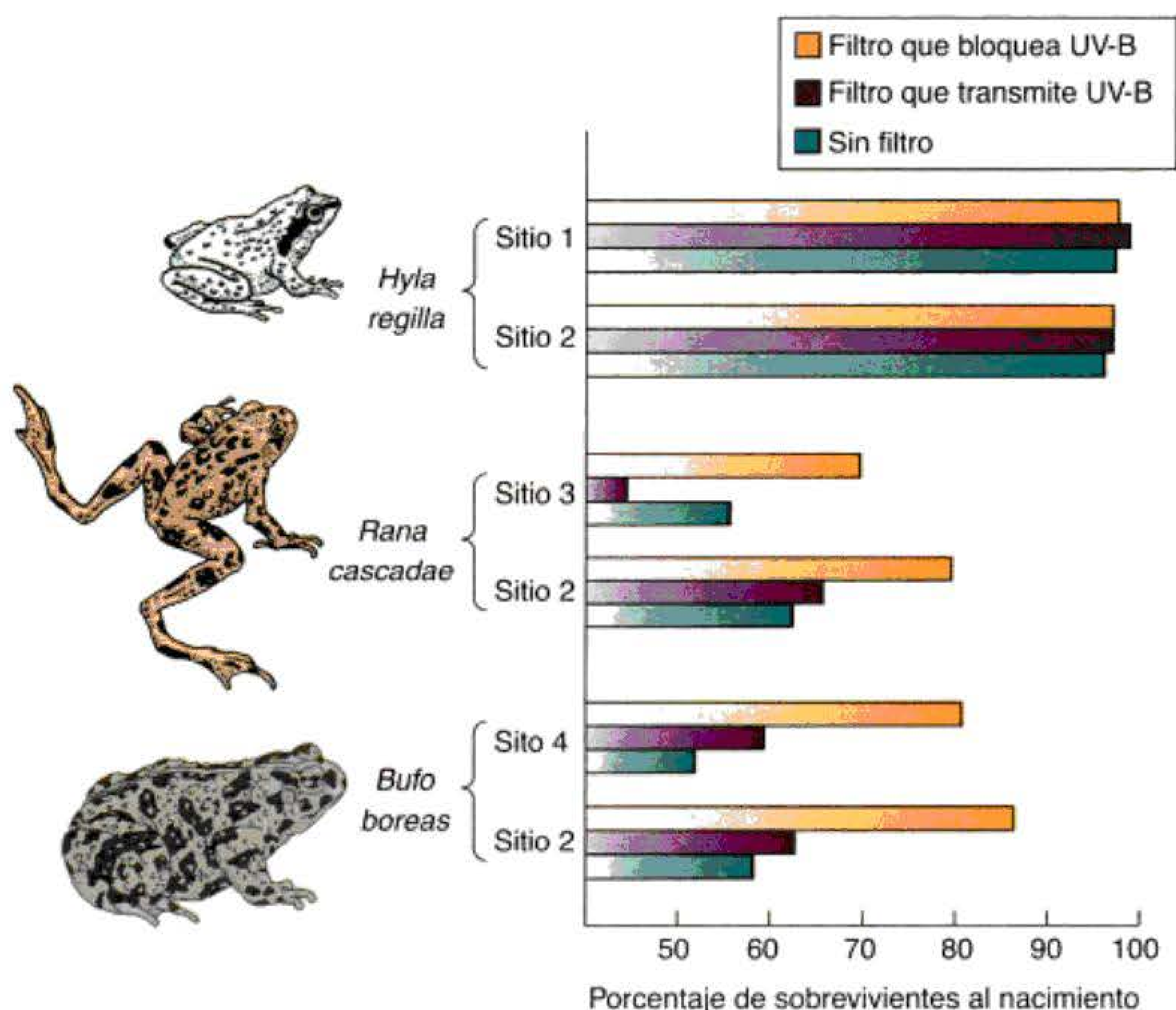


Fig. 3-6. Porcentajes de eclosiones sucesivas en tres especies de anfibios en su ambiente natural. En cada uno de los dos sitios, los huevos fueron colocados en recintos sin protección, protegidos con una pantalla de acetato que admitía radiaciones UV-B, o protegidos por una pantalla de Mylar que bloqueaba las radiaciones UV-B. Los huevos de ranas de árbol *Hyla regilla* eclosionaron satisfactoriamente bajo las tres condiciones. Los huevos de *Rana cascadae* y del sapo *Bufo boreas* eclosionaron significativamente mejor cuando fueron protegidos de las radiaciones UV-B. (Según Blaustein y col.1994.)

filtro que impedía a las UV-B alcanzar los huevos. Para *Hyla regilla*, los filtros no tuvieron efecto y los nacimientos sucesivos fueron excelentes bajo las tres condiciones. Sin embargo, para *Rana cascadea* y para *Bufo boreas*, el filtro que bloqueaba las UV-B aumentó el porcentaje de huevos nacidos desde alrededor de un 60% hasta cerca de un 80%.

Los efectos de la radiación UV-B en la mediación de la disminución de la población de anfibios parecen ser complejos, involucrando cambios climáticos y hongos patógenos. Utilizando datos de observaciones de largo plazo y mediante la manipulación de la profundidad del agua de la laguna en las que las ranas depositan sus huevos, Kiesecker y col. (2001) mostraron que las reducciones inducidas por el clima en la profundidad del agua de estanque incrementan la exposición de los huevos y embriones a la radiación UV-B y, en consecuencia, aumentan su vulnerabilidad a la infección por hongos. En estos estudios, la profundidad del agua y la exposición a UV-B en el noroeste del Pacífico de los Estados Unidos estuvo fuertemente relacionada con los ciclos de El Niño. Además, las elevadas temperaturas de la superficie del mar en el Pacífico sur desde mediados de la década de 1970, que han afectado el clima en la mayor parte del mundo, podrían producir las condiciones para las disminuciones anfibias mediadas por patógenos en muchas regiones. Por esta razón, la radiación UV-B puede ser el factor que relaciona los cambios en el clima con los cambios en la mortalidad de los anfibios.

Cuando la *Entwicklungsmechanik* fue establecida, los programas de embriología experimental ambiental eran una parte fundamental de esta disciplina. Sin embargo, rápidamente llegó a ser obvio que las variables experimentales podrían ser mejor controladas en el laboratorio que en el ambiente natural, y que un científico podría hacer un mayor número de experimentos en el laboratorio. Así, en las dos primeras décadas del siglo XX se redujo en embriología la experimentación en los ambientes naturales (véase Nyhart 1995). Sin embargo, con el aumento de nuestras preocupaciones sobre el ambiente, esta área del desarrollo ha llegado a ser cada vez más importante. Otros trabajos recientes en este campo se detallan en el capítulo 22.

La dinámica del desarrollo de la especificación de la célula

Los ambientes de un embrión pueden ser la charca de la marea, una laguna o el útero. Como hemos visto anteriormente, el embrión interactúa con su ambiente, y su trayectoria de desarrollo puede ser guiada por la información de su alrededor. En pequeña escala, el ambiente de una célula embrionaria consiste en los tejidos que la rodean dentro del embrión, y el destino de esta célula (p. ej., si ésta llega a ser parte de la piel o del cristalino) con frecuencia depende de sus interacciones con otros componentes de su "ecosistema" inmediato.

Por lo tanto, un segundo programa de investigación de embriología experimental estudia cómo las interacciones entre las células embrionarias generan al embrión. El desarrollo de un tipo celular especializado es denominado **diferenciación** (cuadro 3-2). Estos cambios manifiestos en la bioquímica y función celulares están precedidos por un proceso cuyo resultado es el **compromiso** de la célula a un destino cierto. En este punto, aun cuando la célula o tejido no se diferencia fenotípicamente con respecto a su estado no comprometido, su destino de desarrollo ha llegado a ser restringido.

El proceso de compromiso puede ser dividido en dos estados (Harrison 1933; Slack 1991). El primer estado es una fase lábil denominada **especificación**. El destino de una célula o tejido se dice que está especificado cuando son capaces de diferenciarse autónomamente al colocarse

Cuadro 3-2. *Algunos tipos celulares diferenciados y sus principales productos*

Tipo celular	*Producto de la célula diferenciado*	*Funciones especializadas*
Queratinocito (célula epidérmica)	Queratina	Protección contra la abrasión y la desecación
Eritrocito (célula sanguínea roja)	Hemoglobina	Transporte de oxígeno
Célula del cristalino	Cristalinas	Transmisión de luz
Linfocito B	Inmunoglobulinas	Síntesis de anticuerpos
Linfocito T	Citocinas	Destrucción de células extrañas; regulación de la respuesta inmune
Melanocito	Melanina	Producción de pigmentos
Islote celular pancreático	Insulina	Regulación del metabolismo de hidratos de carbono
Célula de Leydig (♂)	Testosterona	Características sexuales masculinas
Condroicito (célula del cartílago)	Condroitín sulfato; colágeno tipo II	Ligamentos y tendones
Osteoblasto (célula formadora de hueso)	Matriz ósea	Soporte esquelético
Miocito (célula muscular)	Actina y miosina muscular	Contracción
Hepatocito (célula hepática)	Albúmina sérica; numerosas enzimas	Producción de proteínas del suero y numerosas funciones enzimáticas
Neuronas	Neurotransmisores (acetilcolina, adrenalina, etc.)	Transmisión del impulso eléctrico
Célula tubular (♀) del oviducto de la gallina	Ovoalbúmina	Proteínas blancas del huevo para nutrición y protección del embrión
Célula folicular (♀) del ovario del insecto	Proteínas del corion	Proteínas de la cáscara del huevo para la protección del embrión

en un ambiente neutral, como una placa de Petri o un tubo de ensayo. (El ambiente es neutral con respecto al camino del desarrollo.) En este estado, todavía es posible revertir el compromiso. El segundo estado de compromiso es la **determinación**. Se dice que una célula o tejido es determinada cuando es capaz de diferenciarse autónomamente aun cuando se la coloca en otra región del embrión. Si esto permite la diferenciación de acuerdo con su destino original aun bajo estas circunstancias, se acepta que el compromiso es irreversible.*

Especificación autónoma

Se han descrito tres modos básicos de compromiso (cuadro 3-3; Davidson 1991). El primero es denominado **especificación autónoma**. En este caso, si una blastómera en particular se quita de un embrión temprano en desarrollo, esta blastómera aislada producirá los mismos tipos celulares que hubiese generado de haber formado parte todavía del embrión (fig. 3-7). Además, el embrión a partir del cual la blastómera es quitada perderá aquellas células (y solo aquellas células) que tendría que haber producido la blastómera perdida. La especificación autónoma da origen a un patrón de embriogénesis referido como **desarrollo en mosaico**, debido a que el embrión parece construirse como un mosaico de baldosas de regiones autodiferenciadas independientes. Los embriones de invertebrados, especialmente los de moluscos, anélidos y tunicados, utilizan a menudo la especificación autónoma para determinar los destinos de sus células. En estos embriones, los **determinantes morfogenéticos** (ciertas proteínas o RNA mensajeros) son colocados en diferentes regiones del citoplasma del gameto femenino (si es fecundado será célula huevo) y son repartidos entre las distintas células a medida que el embrión se divide. Estos determinantes morfogenéticos especifican el tipo celular.

La especificación autónoma fue demostrada por primera vez en 1887 por un estudiante de medicina francés, Laurent Chabry. Chabry deseaba conocer las causas de las anomalías del desarrollo, y pensó que tales malformaciones podían ser causadas por la carencia de ciertas células. Decidió llevar a cabo experimentos de embriones

* Cabe recordar la explicación del capítulo previo sobre especificación de esporas y células filamentosas en el moho del limo *Dictyostelium*. Esta irreversibilidad de determinación y diferenciación es solo con respecto al desarrollo normal. Como se ha mostrado en el caso de Dolly y de otros animales clonados, el núcleo de una célula diferenciada puede ser reprogramado experimentalmente para dar origen a cualquier tipo celular del cuerpo. Detallamos este fenómeno en el capítulo siguiente.

Cuadro 3-3. *Modos de especificación de tipo celular y sus características*

I Especificación autónoma
- Característica de la mayoría de los invertebrados
- Especificación por adquisición diferencial de algunas moléculas citoplasmáticas presentes en el huevo (gameto femenino sin fecundar o célula huevo si ha sido fecundado)
- De modo constante la segmentación produce los mismos linajes en cada embrión de la especie. Los destinos de los blastómeras son generalmente constantes
- La especificación del tipo celular precede a cualquier migración embrionaria en gran escala
- Produce un desarrollo en "mosaico": las células no pueden cambiar su destino si se pierde una blastómera

II Especificación condicional
- Característica de todos los vertebrados y de unos pocos invertebrados
- Especificación mediante interacción entre las células. Las posiciones relativas son importantes
- Las segmentaciones variables producen células sin una asignación constante de destino
- Las reorganizaciones celulares masivas y las migraciones preceden o acompañan a la especificación
- Capacidad "regulativa" del desarrollo: permite a las células adquirir diferentes funciones

III Especificación sincitial
- Característica de la mayoría de las clases de insectos
- Especificación de las regiones del cuerpo mediante interacciones entre regiones citoplasmáticas antes de la celularización del blastodermo
- Las segmentaciones variables producen células con destinos no rígidos para núcleos específicos
- Después de la celularización, la especificación condicional es lo observado con mayor frecuencia

de tunicado, debido a que ellos tenían células relativamente grandes y eran abundantes en una bahía cercana. Ésta fue una elección afortunada, debido a que los embriones de tunicado se desarrollan con rapidez a larva con relativamente pocas células y escasos tipos celulares (Chabry 1887; Fischer 1991). Chabry comenzó a producir malformaciones específicas mediante el aislamiento o el corte de una blastómera de un embrión de tunicado durante la segmentación. Descubrió que cada blastómera era responsable de la producción de un grupo específico de tejidos larvales (fig. 3-8). Ante la ausencia de una blastómera específica, la larva carece de las estructuras que normalmente son formadas por aquellas células. Además, observó que células específicas que eran aisladas del resto del embrión formaban sus características estructurales separadas del

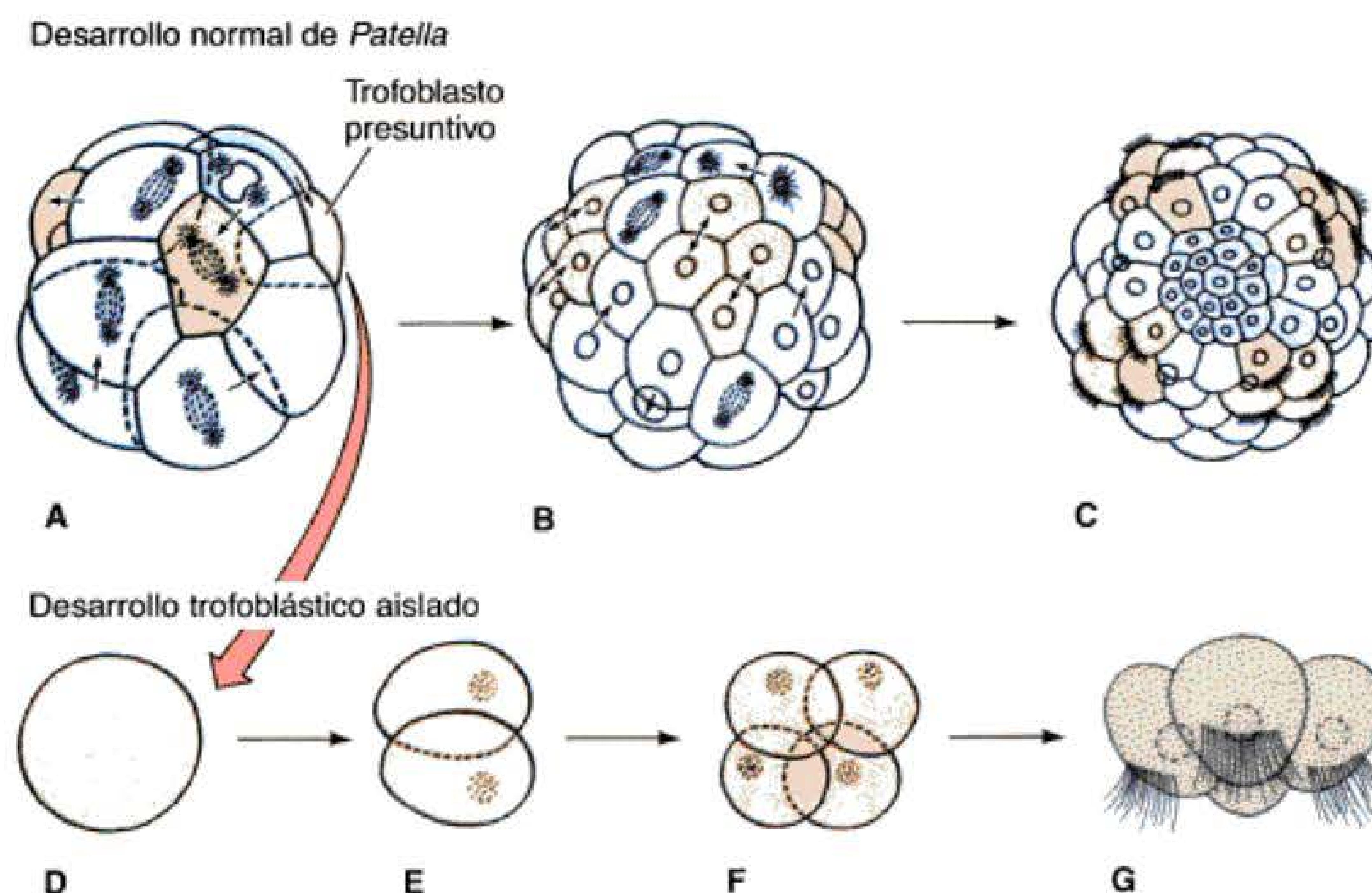


Fig. 3-7. Especificación autónoma (desarrollo en mosaico). **(A-C)** Diferenciación de las células del trofoblasto (ciliadas) del molusco *Patella*. **A.** Estado de 16 células visto de lado; las células del trofoblasto presuntivo están sombreadas. **B.** Estado de 48 células. **C.** Estadio larval ciliado, visto desde el polo animal. **D-G.** Diferenciación de células de trofoblasto de *Patella* aisladas a partir de un estado de 16 células y cultivadas in vitro. **E-F.** Resultados de la primera y segunda divisiones en cultivo. **G.** Productos ciliados de **(F)**. Aun en cultivos aislados, estas células se dividen y se convierten en ciliadas en el tiempo correcto. (Según Wilson 1904.)

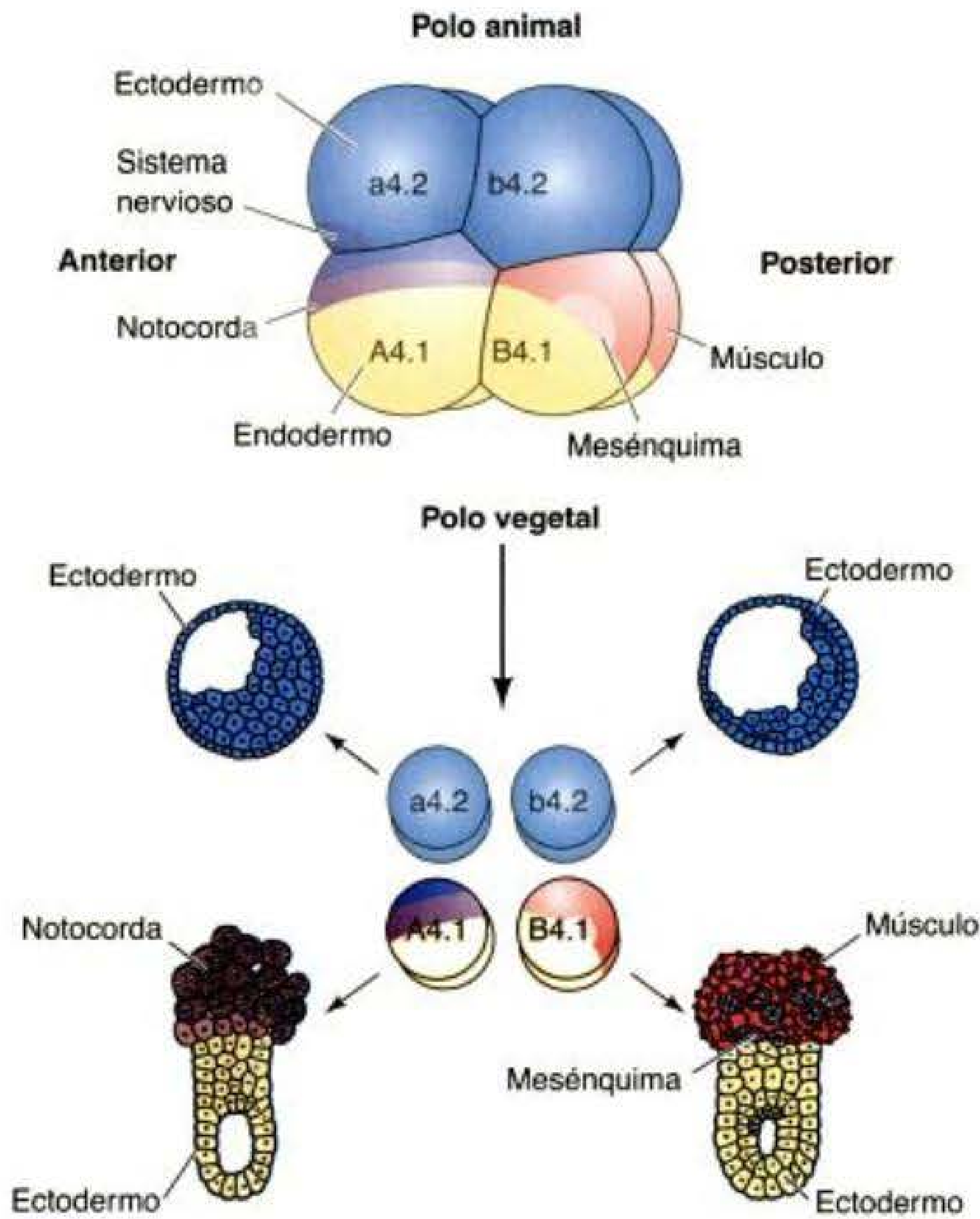


Fig. 3-8. Especificación autónoma en los embriones tempranos de tunicados. Cuando los cuatro pares de blastómeras de un embrión de 8 células son disociados, cada una da origen a la estructura que debería haber formado si se mantenía dentro del embrión (El mapa de destino de los tunicados muestra que los lados izquierdo y derecho producen linajes celulares idénticos.) (Según Reverberi y Minganti 1946.)

contexto de las otras células. Por esta razón, cada una de las células de tunicado parece desarrollarse de forma autónoma.*

Estudios recientes han confirmado que cuando una célula específica de un embrión de tunicado de 8 células es quitada, el embrión carece de las estructuras que normalmente produciría la célula perdida, y las células aisladas producen estas estructuras separadas del embrión. J. R. Whittaker proporcionó confirmaciones bioquímicas espectaculares de la segregación citoplasmática de los determinantes morfogenéticos responsables de este patrón. Whittaker (1973) llevó a cabo la tinción de blastómeras para la presencia de la enzima acetilcolinesterasa. Esta enzima se encuentra únicamente en el tejido muscular y está involucrada en permitir al músculo de la larva responder a impulsos nerviosos repetidos. A partir de los estudios de linaje celular de Conklin y otros (véase cap. 1), se supo que solo un par de blastómeras (el par vegetal posterior, B4.1) en el embrión de tunicado de 8 células es capaz de producir tejido muscular de la cola. (Como discutimos en el capítulo 1, el par de blastómeras B4.1 contiene el citoplasma de medialuna amarilla *–yellow crescent–* que está relacionado con la determinación muscular.) Cuando Whittaker quitó estas dos células y las colocó en aislamiento, produjeron tejido muscular que se teñía positivamente para la presencia de acetilcolinesterasa (fig. 3-9). Cuando transfirió algo de citoplasma de medialuna amarilla de una blastómera B4.1 (formador de músculo) hacia la blastómera b4.2 (formador de ectodermo) de un embrión de tunicado de 8 células, la blastómera formadora de ectodermo generó células musculares así como su progenie normal de ectodermo (fig. 3-10; Whittaker 1982). El mecanismo de especificación autónoma será detallado en el capítulo 8.

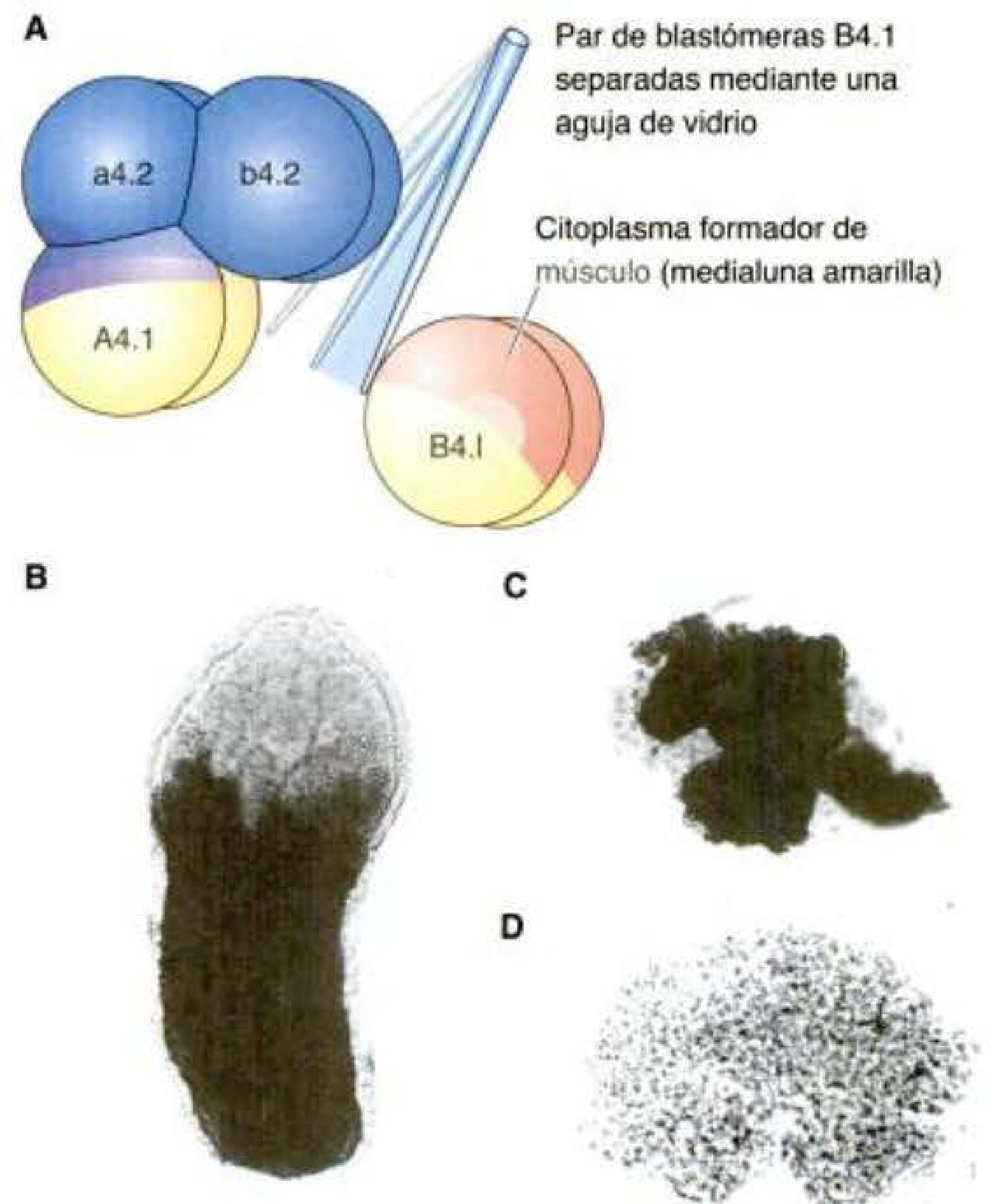


Fig. 3-9. Acetilcolinesterasa en la progenie de las blastómeras de linaje muscular (B4.1) aisladas a partir de un embrión de tunicado en el estado de 8 células. **A.** Diagrama del procedimiento de aislamiento. **B.** Localización de la acetilcolinesterasa en los músculos de la cola de una larva de tunicado intacta. La presencia de la enzima es demostrada por la tinción oscura. Cuando son incubados durante el mismo período en el que normalmente alcanzarían la forma de una larva, se observa la misma tinción oscura en la progenie del par de blastómeras de B4.1 **(C)**, pero no en las 6/8 restantes del embrión **(D)**. (De Whittaker 1977; fotografías cortesía de J. R. Whittaker.)

* Ésta no fue la respuesta esperada por Chabry, nada de lo que él había deseado encontrar. En la Francia del siglo XIX, los conservadores favorecieron las posturas preformacionistas, que fueron interpretadas para apoyar las desigualdades hereditarias entre miembros de una comunidad humana. Lo que usted era había sido determinado por su linaje. Los liberales, en especial los socialistas, favorecieron la postura epigenética, que fue interpretada para indicar que cada uno comienza con la misma herencia de desarrollo, y que nadie tiene "derecho" a una posición más elevada que cualquier otra persona. Chabry, un socialista que odiaba los derechos heredados de los aristócratas, puso mucho esfuerzo en no extrapolar sus datos a nada más allá de los embriones de tunicados (véase Fischer 1991).

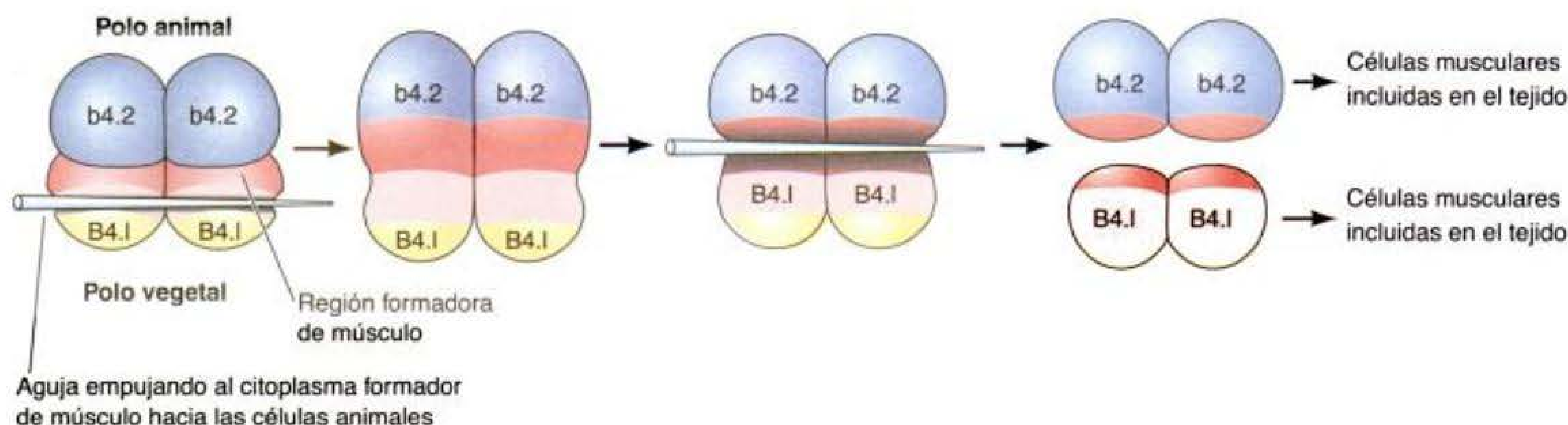


Fig. 3-10. La microcirugía en células huevo de tunicado provoca que algo del citoplasma en medialuna amarilla de las blastómeras formadoras de músculo B4.1 ingrese en el par de blastómeras b4.2 (productoras de epidermis y nervio). Presionando a las blastómeras B4.1 con una aguja de vidrio se provoca la regresión del surco de segmentación. El surco se volverá a formar en una posición más vegetal donde las células son cortadas con una aguja. El nuevo surco de este modo separará a la células de manera tal que las blastómeras b4.2 reciben algo de citoplasma B4.1 formador de músculo ("medialuna amarilla *-yellow crescent-*"). Estas células b4.2 modificadas producen células musculares así como a su progenie ectodérmica normal. (Según Whittaker 1982.)

Especificaciones condicionales

EL FENÓMENO DE LA ESPECIFICACIÓN CONDICIONAL. Un segundo modo de compromiso involucra la interacción entre células vecinas. En este tipo de especificación, cada célula tiene originalmente la capacidad de llegar a ser muchos tipos celulares diferentes. Sin embargo, las interacciones de las células con otras células restringen el destino de uno o más participantes. Este modo de compromiso a veces es denominado **especificación condicional** debido a que el destino de una célula depende de las condiciones con las que la célula se encuentra. Si una blastómera es quitada de un embrión temprano que utiliza especificación condicional, las células restantes del embrión alteran sus destinos de modo tal que las funciones de las células perdidas pueden ser recuperadas. Esta capacidad de las células embrionarias para cambiar sus destinos compensando la pérdida de las partes es denominada **regulación** (fig. 3-11). La blastómera aislada puede dar origen a una amplia variedad de tipos celulares (y a veces genera tipos celulares que la célula normalmente no originaría si ésta todavía formara parte del embrión). Por esta razón, la especificación condicional da origen a un patrón de embriogénesis denominado **desarrollo regulativo**.* El desarrollo regulativo es visto en la mayoría de los embriones de vertebrados, y obviamente es crítico en el desarrollo de los gemelos idénticos (monocigóticos). En la formación de tales gemelos, las células en estado de segmentación de un solo embrión se separan en dos grupos, y cada grupo de células produce el desarrollo completo de un individuo (fig. 3-12).

La investigación que condujo a descubrir la especificación condicional comenzó con el examen de una hipótesis que demandaba que tal cosa no sucedía. En 1893, August Weismann propuso el primer modelo de la especificación celular que se podía poner a prueba experimentalmente, la **teoría del plasma germinal**. Basado en el escaso conocimiento viable de aquella época sobre la fecundación, Weismann de manera audaz propuso que el espermatozoide y el gameto femenino proporcionaban

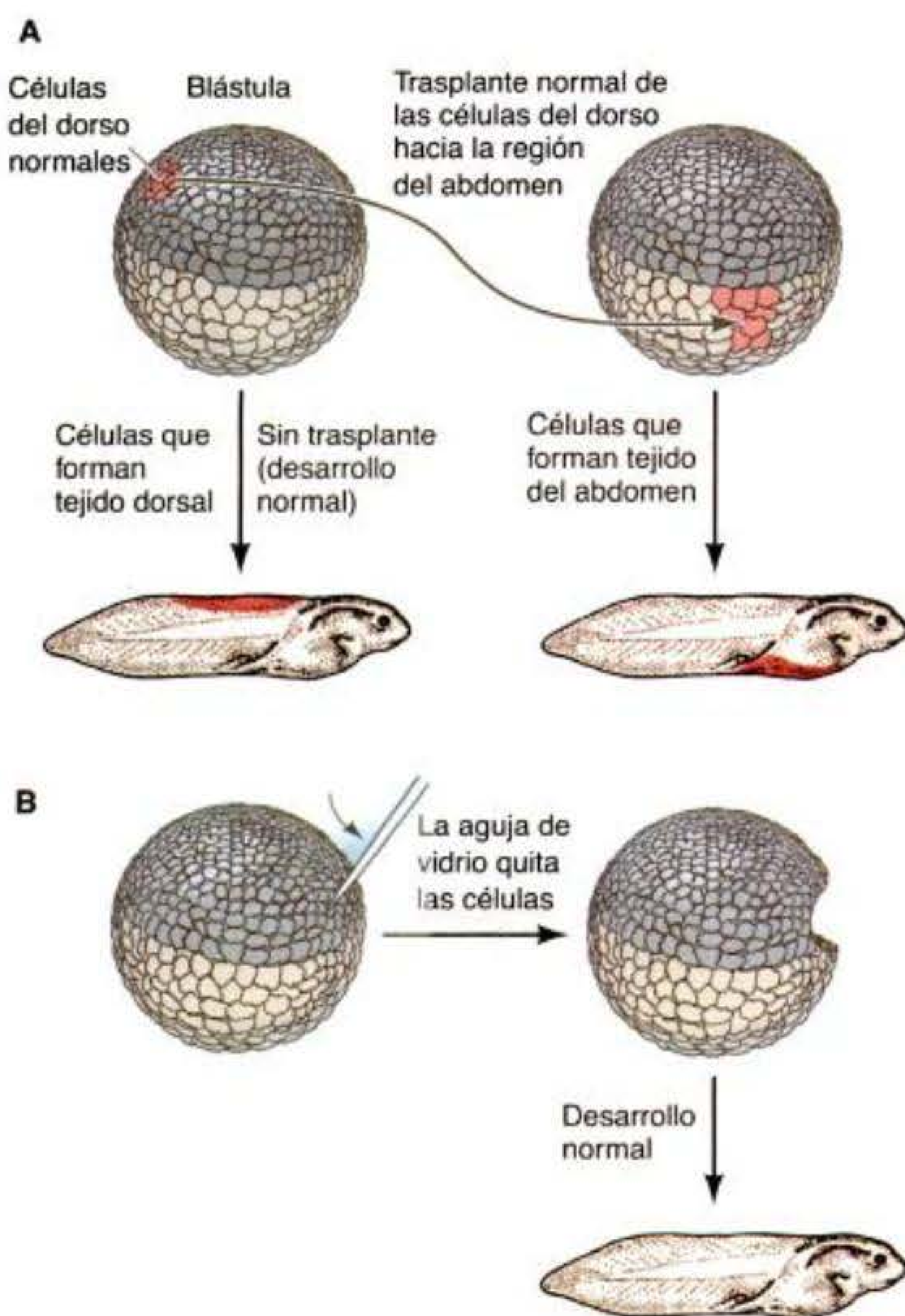


Fig. 3-11. Especificación condicional. **A.** Lo que una célula llegue a ser depende de su posición en el embrión. Su destino es determinado por interacciones con las células vecinas. **B.** Si las células son quitadas del embrión, las células restantes pueden regular y compensar esta parte perdida.

* Sydney Brenner (citado en Wilkins 1993) ha destacado que el desarrollo animal puede continuar de acuerdo con el plan europeo o americano. Bajo el plan europeo (especificación autónoma), se es lo que los progenitores eran; el linaje es importante. Bajo el plan americano (especificación condicional), las células comienzan siendo indeterminadas, pero con ciertas predisposiciones. Hay mucha mezcla, los linajes no son críticos y uno tiende a convertirse en lo que sus vecinos son.

iguales contribuciones cromosómicas, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, para el nuevo organismo. Además, postuló que los cromosomas llevaban los potenciales heredados de este nuevo organismo.* Sin embargo, se pensaba que no todos los determinantes de los cromosomas entraban en cada célula del embrión. Se sostuvo la hipótesis de que los cromosomas, en lugar de dividirse equitativamente, se dividían en un sentido tal que los diferentes determinantes cromosómicos entraban en distintas células. Mientras que la célula huevo transporta todos los complementos de determinantes, algunas células somáticas podrían retener los determinantes "formadores de sangre" mientras que otros podrían retener los determinantes "formadores de músculo", etc. (fig. 3-13). Solo en los núcleos de las células destinadas a convertirse en gametos (las células germinales) se encontraban todos los tipos de determinantes que se pensaba debían ser conservados. El núcleo de todas las otras células podría tener solo un subgrupo de los tipos de determinantes originales.

Al postular este modelo, Weismann había propuesto una hipótesis de desarrollo que podía ser examinada inmediatamente. Basado en los mapas de destino de los embriones de rana, Weismann afirmó que cuando la primera división de segmentación separa la futura mitad derecha del embrión de la futura mitad izquierda, esto podría ser una separación en las blastómeras resultantes entre los determinantes "de la derecha" y los determinantes "de la izquierda". En el examen de esta hipótesis se aplicaron por primera vez tres de las cuatro técnicas involucradas en embriología experimental:

- El **defecto experimental**, en el cual se destruye una porción del embrión y luego se observa el desarrollo del embrión dañado.
- El **aislamiento experimental**, en el cual se quita una porción del embrión y luego se observa el desarrollo del embrión parcial y de la región aislada.
- El **experimento de recombinación**, en el cual se observa el desarrollo del embrión luego de reemplazar una parte original con una parte de una región diferente del embrión.
- El **experimento de trasplante**, en el cual una porción del embrión es reemplazada por una porción tomada desde un embrión diferente. Esta cuarta técnica fue usada por algunos de los mismos científicos cuando en primer lugar construyeron los mapas de destino de los embriones tempranos (véase cap. 1).

* Los embriólogos estuvieron pensando en estos términos unos quince años antes del redescubrimiento del trabajo de Mendel. Weismann (1892, 1893) también especuló que estos determinantes nucleares de herencia funcionaban por las sustancias que elaboran y que llegan a ser activas en el citoplasma!



Fig. 3-12. En el estado de desarrollo temprano de muchos vertebrados, la separación de las células embrionarias en dos partes puede generar gemelos. Este fenómeno se produce esporádicamente en seres humanos. Sin embargo, en el armadillo de nueve bandas, *Dasypus novemcinctus*, el embrión original siempre se escinde en cuatro grupos separados de células, cada uno de los cuales forma su propio embrión. (Fotografía cortesía de K. Benirschke.)

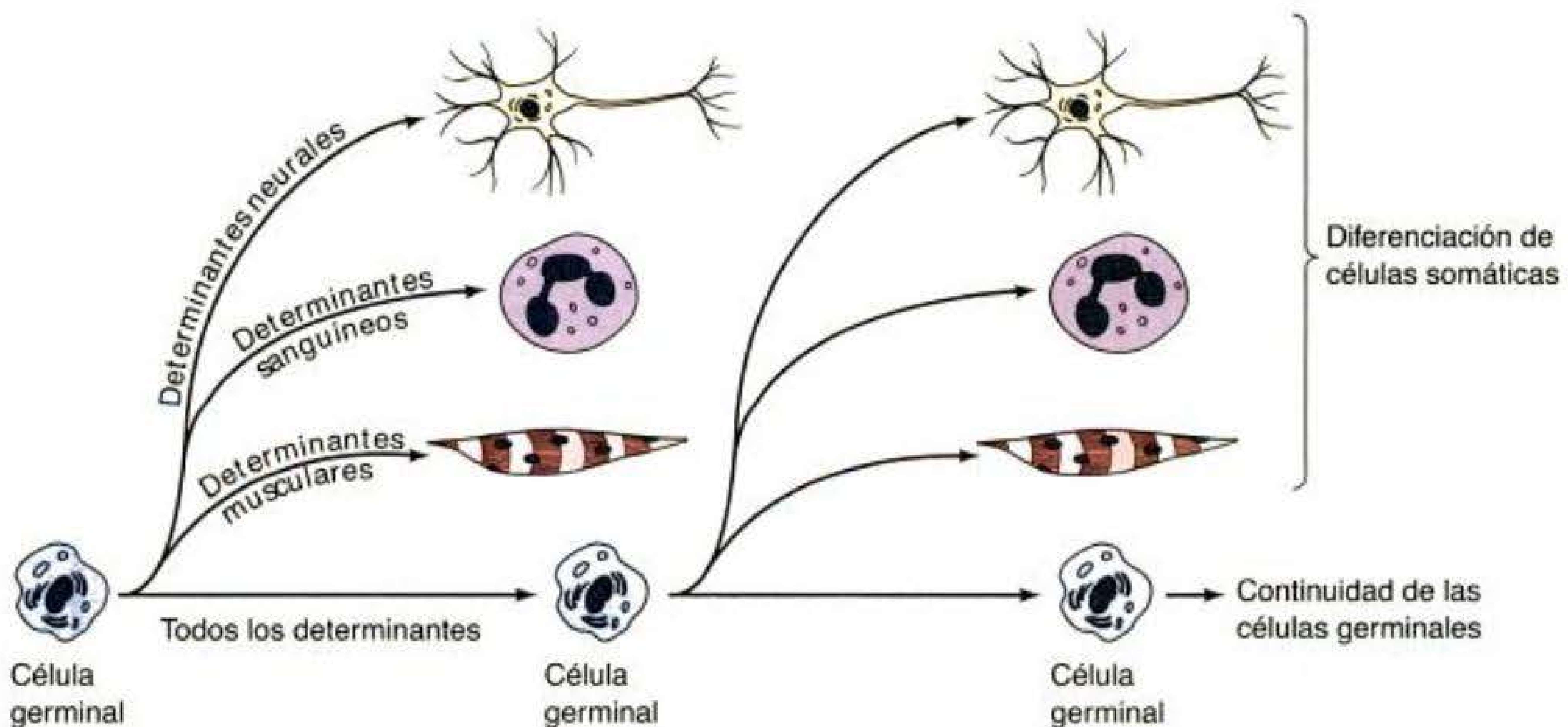


Fig. 3-13. Teoría de Weismann de la herencia. Las células germinales darán origen a células somáticas diferenciadas del cuerpo (indicadas en color), así como a nuevas células germinales (azul). Weismann sostuvo la hipótesis de que solo las células germinales contienen todos los determinantes hereditarios. Se pensaba que las células somáticas contenían un subgrupo de determinantes. Los tipos de determinantes encontrados en el núcleo determinarían el tipo celular. (Según Wilson 1896.)

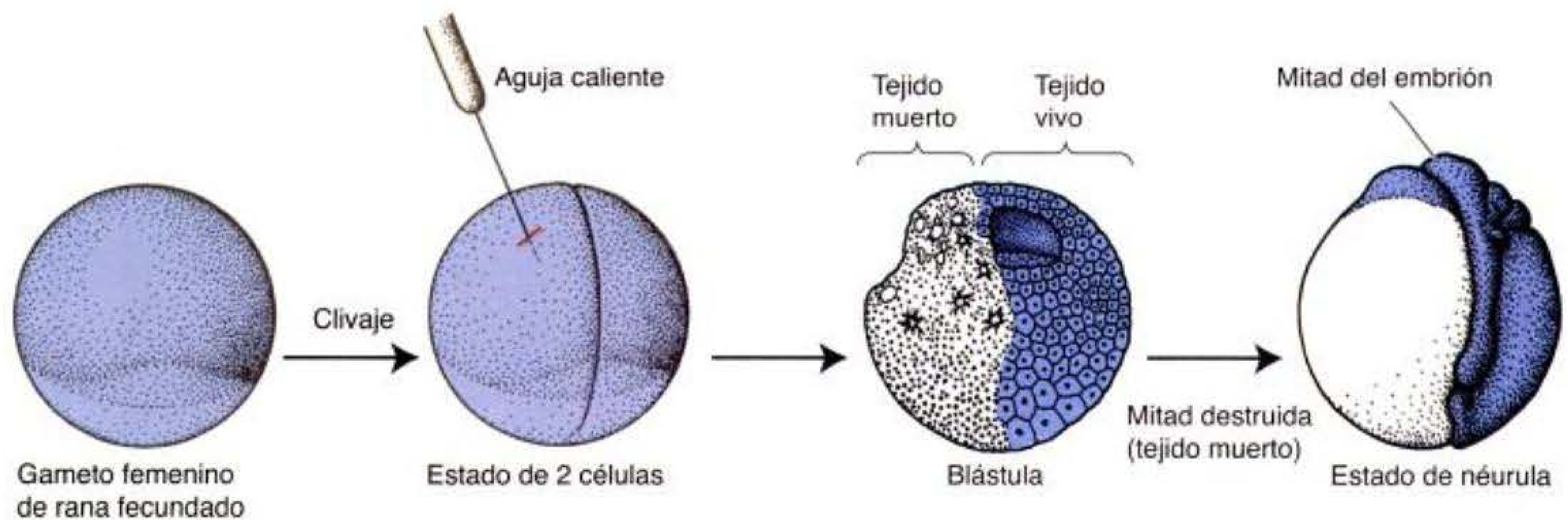


Fig. 3-14. Intento de Roux para demostrar el desarrollo en mosaico. La destrucción (pero no la eliminación) de una célula de un embrión de rana de 2 células produce el desarrollo de solo una mitad del embrión.

Uno de los primeros científicos en poner a prueba la hipótesis de Weismann fue Wilhelm Roux, un joven embriólogo alemán. En 1888, Roux publicó los resultados de una serie de defectos experimentales en los cuales él tomó embriones de rana de 2 y 4 células y destruyó algunas de las células de cada embrión con una aguja caliente. La hipótesis de Weismann predijo la formación de las mitades derecha o izquierda del embrión. Roux obtuvo mitades de blástula, tal como Weismann había predicho (fig. 3-14). Éstas desarrollaron hasta media néurula teniendo un lado derecho o izquierdo completo, con un pliegue neural, una fosa auditiva, etc. Por esta razón, concluyó que los embriones de rana eran un mosaico de partes que se autodiferenciaban, y que cada célula recibía probablemente un grupo específico de determinantes lo que llevaba a su consecuente diferenciación.

Nadie más que Hans Driesch apreció el trabajo y la aproximación experimental a la embriología de Roux. El objetivo de Driesch era explicar el desarrollo en términos de leyes de la física y de la matemática. Sus investigaciones iniciales fueron similares a las de Roux. Sin embargo, mientras que los estudios de Roux fueron experimentos de *defecto* que respondían a la pregunta de cómo las blastómeras restantes de un embrión podrían desarrollarse cuando un subgrupo de blastómeras era destruido, Driesch (1892) trató de extender esta investigación mediante la realización de experimentos de *aislamiento*. Separó blastómeras del erizo de mar entre sí mediante agitación enérgica (o, posteriormente, por colocarlos en agua de mar libre de calcio). Para su sorpresa, cada una de las blastómeras de los embriones de 2 células se desarrollaba en una larva completa. Del mismo modo, cuando Driesch separó las blastómeras de los embriones de 4 y 8 células, algunas de las células aisladas producían una larva plútea entera (fig. 3-15).

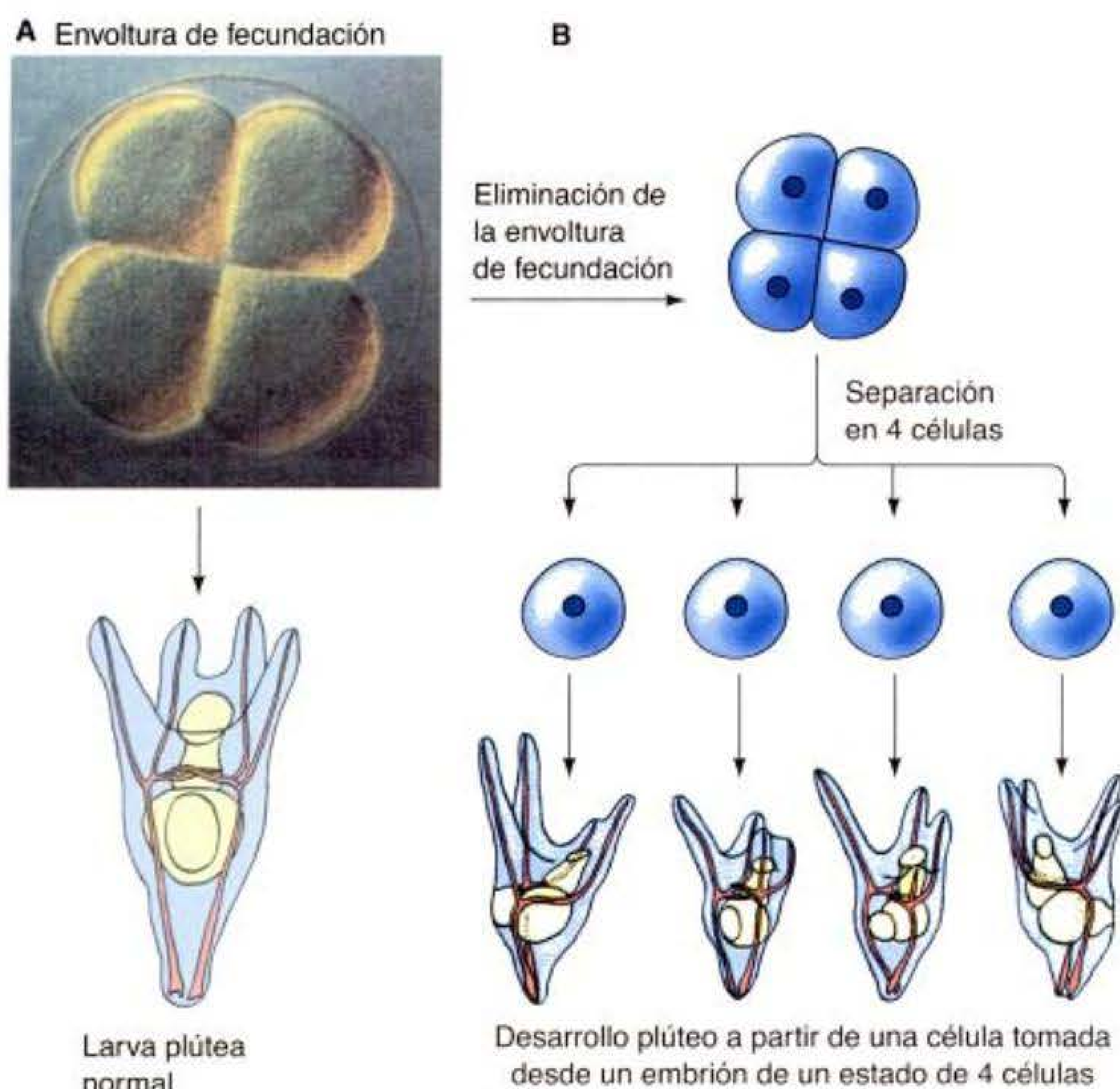


Fig. 3-15. Demostración de Driesch del desarrollo regulativo. **A.** Un embrión intacto de 4 células de erizo de mar genera una larva plútea normal. **B.** Cuando se quita la envoltura de fecundación de las 4 células del embrión y se aíslan las cuatro células, cada célula puede formar una larva plutea más pequeña, pero normal. (Todas las larvas están dibujadas a la misma escala.) Obsérvese que las cuatro larvas derivadas en ese sentido no son idénticas, a pesar de su capacidad para generar todos los tipos celulares necesarios. Tales variaciones se ven también en el erizo de mar adulto formado de esta manera (Marcus 1979). (Fotografía cortesía de G. Watchmaker.)

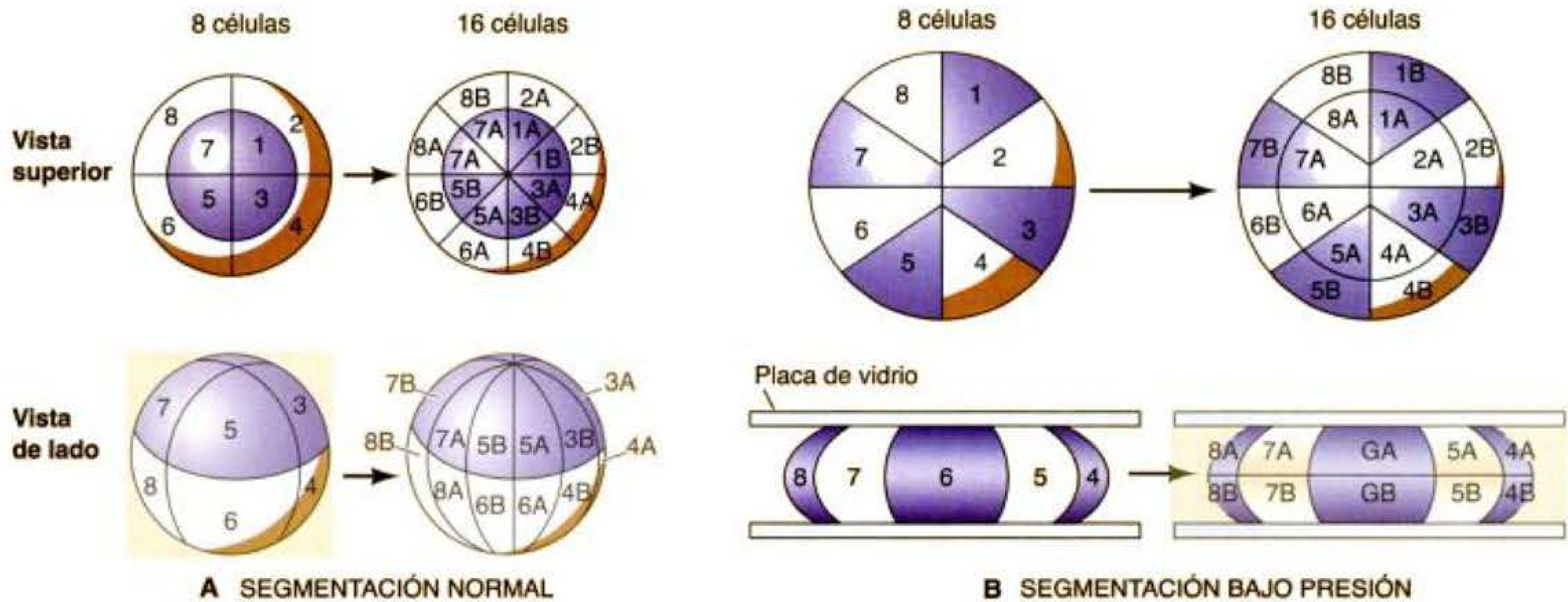


Fig. 3-16. Experimentos de Driesch presionando con placas para alterar la distribución de los núcleos. **A.** Segmentación normal en embriones de erizo de mar de 8 a 16 células, vistos desde el polo animal (secuencia superior) y de lado (secuencia inferior). **B.** Planos de segmentación anormal formados bajo presión, como se ven a partir del polo animal y de lado. (Según Huxley y de Beer 1934.)

Éste era un resultado drásticamente diferente del de las predicciones de Weismann o Roux. Más que la diferenciación por sí misma en su futura parte embrionaria, cada blastómera aislada reguló su desarrollo para producir un organismo completo. Además, estos experimentos proporcionaron el primer ejemplo experimental observable del desarrollo regulativo.

Driesch confirmó el desarrollo regulativo en los embriones de erizo de mar mediante la realización de una recombinación experimental complicada. En las células huevo de los erizos de mar (huevos), los dos primeros planos de clivaje son normalmente meridionales, pasando a través de los polos animal y vegetal, mientras que la tercera división es ecuatorial, dividiendo al embrión en cuatro células superiores y cuatro inferiores. Driesch (1893) cambió la dirección del tercer plano de clivaje de los embriones tempranos al comprimirlos suavemente entre dos placas de vidrio, provocando de este modo que la tercera división sea meridional como en las dos anteriores. Luego de liberar la presión, la cuarta división fue ecuatorial. Este procedimiento reorganizó a los núcleos, provocando que un núcleo que estaría normalmente en la región destinada a formar endodermo, ahora estuviera en la región del ectodermo presuntivo. Algunos núcleos que producían normalmente estructuras dorsales se encontraban ahora en las células ventrales (fig. 3-16). Si se ha producido la segregación de los determinantes nucleares (como había sido propuesto por Weismann y Roux), el embrión resultante debería estar extrañamente desordenado. Sin embargo, Driesch obtuvo larvas normales a partir de estos embriones. Concluyó: "La posición relativa de una blastómera dentro del todo probablemente va a determinar de un modo general qué surgirá a partir de éste".

Las consecuencias de estos experimentos para la embriología y personalmente para Driesch fueron trascendentales. Primero, Driesch había demostrado que el potencial esperado de una blastómera aislada (los tipos celulares que se podían llegar a formarse a partir de éste) es mayor que su destino esperado (los tipos celulares que éste podrá originar normalmente a lo largo del curso normal de su desarrollo). De acuerdo con Weismann y Roux, el potencial y el destino esperados de una blastómera tendrían que ser idénticos. Segundo, Driesch concluyó que el embrión del erizo de mar es un "sistema equipotencial armonioso" debido a que todas sus partes potencialmente independientes funcionan en conjunto para formar un único organismo. Tercero, concluyó que el destino de un núcleo depende únicamente de su localización en el embrión. Driesch (1894) sostuvo como hipótesis una serie de acontecimientos en donde el desarrollo avanza por las interacciones entre el núcleo y el citoplasma:

> *En la medida que contiene un núcleo, cada célula, durante el desarrollo, lleva la totalidad del primordio; en cuanto contiene un cuerpo citoplasmático específico de la célula, se le permite específicamente por esto responder únicamente a efectos específicos.*
> *...Cuando el material nuclear se activa, entonces, bajo su dirección, el citoplasma de su célula que había influenciado primero al núcleo es a su vez cambiado, y se establece así la base para un nuevo proceso elemental, que en sí mismo no es solo el resultado sino también una causa.*

Este concepto sorprendentemente moderno de la interacción nuclear-citoplasmática y de la equivalencia nuclear finalmente llevó a Driesch a abandonar la ciencia. Debido a que el embrión podía ser subdividido en partes que eran capaces de volver a formar el organismo entero, él no podía preverlo más como una máquina física. En otras palabras, Driesch había llegado a creer que el desarrollo no podía ser explicado por fuerzas físicas. Rememorando a Aristóteles, invocó una fuerza vital, entelequia ("fuerza interna objetivo-dirigida"), para explicar cómo avanza el desarrollo. En esencia, creía que el embrión estaba imbuido con una psique interna y la sabiduría para alcanzar sus objetivos a pesar de los obstáculos embriológicos colocados en el camino. Driesch, incapaz de explicar sus resultados en términos

Cuadro 3-4. *Procedimientos experimentales y resultados de Roux y Driesch*

Investigador	*Organismo*	*Tipos de experimento*	*Conclusión*	*Interpretación referente al potencial y al destino*
Roux (1888)	Rana *(Rana fusca)*	Defecto	Desarrollo en mosaico (especificación autónoma)	El potencial esperado es igual al destino esperado
Driesch (1892)	Erizo de mar *(Echinus microtuberculatus)*	Aislamiento	Desarrollo regulativo (especificación condicional)	El potencial esperado es mayor que el destino esperado
Driesch (1893)	Erizo de mar *(Echinus y Paracentrotus)*	Recombinación	Desarrollo regulativo (especificación condicional)	El potencial esperado es mayor que el destino esperado

de la física de su época, renunció al estudio de la fisiología del desarrollo y llegó a ser profesor de filosofía, proclamando el vitalismo (la doctrina que las cosas vivas no pueden explicarse únicamente por las fuerzas físicas) hasta su muerte en 1941. Sin embargo, otros, especialmente Oscar Hertwig (1894), pudieron incorporar los experimentos de Driesch en una embriología experimental más sofisticada.*

VADE MECUM[2] **Desarrollo del erizo de mar (Sea urchin development).** Los experimentos de Roux y Driesch manipularon el desarrollo normal. El desarrollo normal del erizo de mar es visto aquí en video y en fotografías marcadas.
[Hacer clic sobre Sea Urchin]

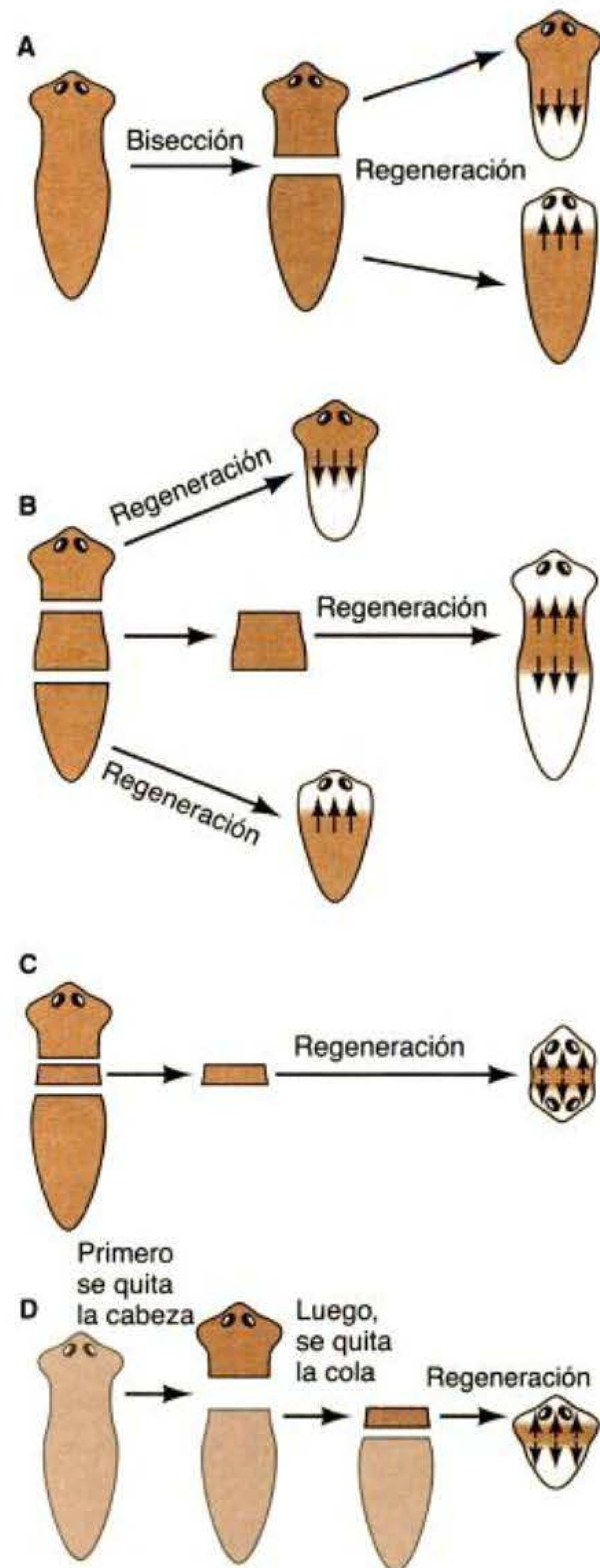
Las diferencias entre los experimentos de Roux y los de Driesch están resumidas en el cuadro 3-4. La diferencia entre los experimentos de aislamiento y los de defecto y la importancia de las interacciones entre las blastómeras fueron resaltadas en 1910, cuando J. F. McClendon mostró que las blastómeras de rana aislada se comportaban como las células separadas del erizo de mar. Por lo tanto, el desarrollo tipo mosaico de las primeras dos blastómeras de la rana en los estudios de Roux era un artefacto del defecto experimental. Algo en o sobre la blastómera muerta todavía informaba a las células vivas de que ésta existía. Por lo tanto, aunque los estudios de Roux y Weismann de la fisiología del desarrollo fueron los primeros, su proposición de que la diferenciación es causada por la segregación de determinantes nucleares pronto se demostró que era incorrecta.

GRADIENTES DE MORFÓGENO. El destino de la célula puede ser especificado por las células vecinas, pero además puede ser especificado por cantidades específicas de moléculas solubles secretadas a distancia de los blancos celulares. Tal molécula soluble es denominada un **morfógeno**, y un morfógeno puede especificar más de un tipo celular mediante la formación de un **gradiente de concentración**.

El concepto de gradientes de morfógeno ha sido utilizado para modelar otro fenómeno del desarrollo regulativo: la **regeneración**. Se sabe desde 1700 que cuando las hidras y los gusanos planos planarias son cortados en la mitad, la mitad de la cabeza puede regenerar la cola a partir del sitio de la herida, mientras que la mitad de la cola puede regenerar la cabeza. Allman (1864) había llamado la atención del hecho que este fenómeno indicaba una polaridad en la organización de la hidra. Sin embargo, no fue hasta 1905 que Thomas Hunt Morgan (1905, 1906) se dio cuenta de que tal polaridad indicaba un principio importante en el desarrollo. Señaló que si la cabeza y la cola en un gusano plano eran separadas, dejando solamente el segmento medio, este segmento puede regenerar una cabeza a partir del antiguo extremo anterior y una cola a partir del antiguo extremo posterior; nunca al revés (fig. 3-17A, B). Además, si el segmento medio era suficientemente pequeño, las porciones regeneradas podían ser anormales (fig. 3-17C). Morgan postuló un gradiente de materiales productor-anterior concentrado en la región de la cabeza. Se puede decir que el segmento medio regeneró ambos extremos por el gradiente de

* Driesch también se convirtió en un abierto oponente de los nazis, y fue uno de los primeros profesores no judíos forzado a retirarse cuando Hitler llegó al poder (Harrington 1996). Hertwig utilizó los experimentos de Driesch y algunos propios para fortalecer dentro de la embriología un tipo de filosofía materialista denominada **organicismo holístico**. Esta filosofía abraza la postura de que 1) las propiedades del conjunto no pueden ser predecidas únicamente a partir de las propiedades de las partes que lo componen, y 2) las propiedades de las partes son informadas por su relación al conjunto. Como una analogía, el significado de una oración depende obviamente del significado de las partes que la componen, las palabras. Sin embargo, el significado de cada palabra depende de la oración entera. En la oración, "Los líderes del partido fueron separados sobre la plataforma," el significado posible de cada sustantivo y verbo está limitado por el significado de la oración en su totalidad y por sus relaciones con otras palabras dentro de la oración. Del mismo modo, el fenotipo de una célula en el embrión depende de sus interacciones con la totalidad del embrión. La visión materialista opuesta es el **reduccionismo**, que sostiene que las propiedades del conjunto pueden ser conocidas si todas las propiedades de las partes son conocidas. La embriología ha apoyado tradicionalmente al organicismo holístico como su ontología (modelo de realidad) mientras mantiene una visión metodológica reduccionista (procedimientos experimentales) (Needham 1943; Haraway 1976; Hamburger 1988; Gilbert y Sarkar 2000).

Fig. 3-17. Regeneración del gusano plano y sus límites. **A.** Si un gusano plano es cortado en dos, la porción anterior de la mitad inferior regenera una cabeza, mientras que la porción posterior de la mitad superior regenera una cola. El mismo tejido puede generar una cabeza (si está en la porción anterior de la pieza de la cola) o la cola (si está en la porción posterior de la pieza de la cola). **B.** Si un gusano plano es cortado en tres piezas, la pieza media regenerará una cabeza a partir de su extremo anterior y una cola a partir de su extremo posterior. **C.** Sin embargo, si la pieza media es demasiado delgada, no hay un gradiente de morfógeno dentro de ésta, y la regeneración es anormal. **D.** Si se demora el segundo corte, sin embargo, de igual modo la sección media delgada forma un gusano normal, debido a que la demora en el tiempo ha permitido el establecimiento de un gradiente anteroposterior. (Según Gosse 1969.)



concentración de estos materiales. Sin embargo, si el trozo era demasiado pequeño, el gradiente no era detectado dentro del segmento. (En realidad es posible que se encuentren dos gradientes en el gusano plano, uno que dirige la formación de la cabeza y otro que dirige la producción de la cola. La regeneración será discutida en más detalle en el capítulo 18.)

VADE MECUM[2] **Regeneración del gusano plano (Flatworm regeneration).** Usted debería verlo con sus propios ojos. Los gusanos planos son fáciles de obtener, y al cortar el animal en la mitad no hay que hacer nada más que lo que el animal se hace a sí mismo. Aquí se encuentran videos e instrucciones para experimentar con estos animales fascinantes. **[Hacer clic sobre Flatworm]**

Desde la década de 1930 hasta la década de 1950, los modelos de gradientes fueron utilizados para explicar la especificación celular condicional en el erizo de mar y en los embriones de anfibio (Hörstadius y Wolsky 1936; Hörstadius 1939; Toivonen y Saxén 1955). En la década de 1960, estos modelos de gradientes se ampliaron para explicar cómo se le podría indicar a las células su posición a lo largo de un eje embrionario (Lawrence 1966; Stumpf 1966; Wolpert 1968, 1969). De acuerdo con tales modelos, una sustancia soluble –el morfógeno– se difunde desde su sitio de síntesis (fuente) hasta su sitio de degradación (salida). Wolper (1968) ilustró tal gradiente de información posicional utilizando "la analogía de la bandera francesa". Imagine una fila de "células de la bandera," en la que cada una es capaz de diferenciarse en células rojas, blancas o azules. Luego imagine un morfógeno cuya fuente se encuentra en el borde izquierdo de la banda azul y cuya salida (degradación) se encuentra en el otro extremo de la bandera, sobre el borde derecho de la banda roja. Así, se forma un gradiente de concentración, que es elevado en un extremo del "tejido de la bandera" y bajo en el otro. La especificación de las células multipotenciales en este tejido es llevada a cabo por la concentración del morfógeno. Las células que detectan una alta concentración de morfógeno se convierten en azules. Entonces hay un umbral de concentración de morfógeno por debajo del cual las células se convierten en blancas. A medida que la concentración de morfógeno disminuye se cae por debajo de otro umbral, las células se convierten en rojas (fig. 3-18A).

Los diferentes tejidos pueden utilizar el mismo sistema de gradiente, pero responden al gradiente de un modo diferente. Si las células que normalmente se convertirán en el segmento medio de una pata de *Drosophila* son quitadas del área formadora de la pata de la larva y colocadas en la región que llegará a ser el extremo de la antena de la mosca, se diferenciarán como el extremo de la pata. Estas células retienen su estado comprometido como células de la pata, pero responden a la información posicional de su ambiente. De este modo, se convierten en las células del extremo de la pata-garras. Este fenómeno, dijo Wolpert, es análogo al trasplante recíproco de porciones de las banderas americana y francesa. Estos segmentos conservarán su identidad (francesa o americana), pero serán posicionalmente especificados (desarrollo del color) de manera apropiada para sus nuevas posiciones (fig. 3-18B).

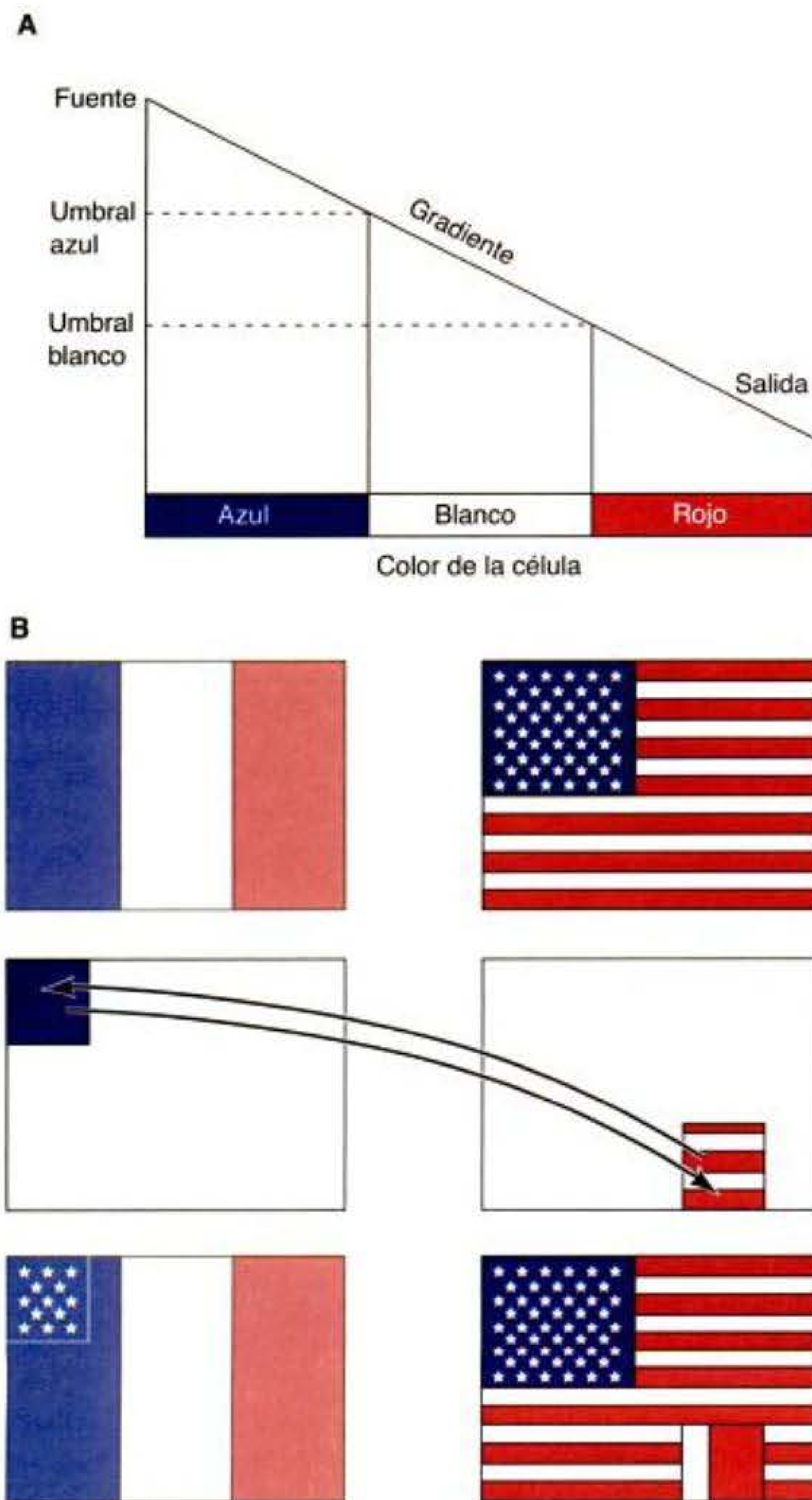


Fig. 3-18. Analogía de la bandera francesa para la operación de un gradiente de información posicional. **A.** En este modelo, la información posicional es producida por gradiente de morfógeno difusible extendido desde una fuente hacia su salida (degradación). El umbral indicado sobre la izquierda corresponde a las propiedades que le permiten interpretar el gradiente. Por ejemplo, las células se convierten en azules a una concentración de morfógeno, pero cuando la concentración desciende por debajo de cierto umbral, las células se convierten en blancas. Donde la concentración cae por debajo de otro umbral, las células se convierten en rojo. El resultado es un patrón de tres colores. **B.** Una característica importante de este modelo es que una pieza de tejido trasplantada desde una región de un embrión a otra retiene su identidad (como era su origen), pero se diferencia de acuerdo con estas nuevas instrucciones posicionales. Este fenómeno es indicado esquemáticamente mediante "injertos" recíprocos entre la bandera de Estados Unidos de América y la bandera francesa. (Según Wolpert 1978.)

SITIO WEB 3.3 **Gradientes de receptores (Receptor gradients).** Además de un gradiente de morfógeno, puede haber también un gradiente de aquellas moléculas que reconocen el morfógeno. El interjuego de los gradientes de morfógeno y de los gradientes de moléculas que los interpretan puede dar origen a interesantes patrones de desarrollo.

Están comenzando a ser identificadas las moléculas involucradas en el establecimiento de gradientes de morfógeno. Para que una molécula difusible sea considerada un morfógeno, se debe demostrar que las células responden directamente a esta molécula y que la diferenciación de aquellas células depende de la concentración de esta molécula. Uno de tales sistemas que en la actualidad está siendo analizado se interesa en la capacidad de diferentes concentraciones de la proteína activina para especificar distintos destinos en la rana *Xenopus*. En la blástula de *Xenopus*, las células en el centro del embrión se convierten en mesodérmicas en respuesta a la activina (o a un componente tipo activina) producido en el hemisferio vegetal. Makoto Asashima y col. (Fukui y Asashima 1994; Ariizumi y Asashima 1994) han mostrado que el casquete animal del embrión de *Xenopus* (que normalmente se convierte en ectodermo, pero que puede ser inducido a formar mesodermo si se trasplanta en otras regiones dentro del embrión) responde diferentemente a distintas concentraciones de activina. Si se dejan sin tratar en solución salina, las blastómeras del casquete animal forman una masa de células parecida a la epidermis. Sin embargo, si fueron expuestos a pequeñas cantidades de activina, forman tejido mesodérmico ventral: sangre y tejido conectivo. Concentraciones progresivamente más elevadas de activina provocarán que las células del casquete animal se desarrollen en otros tipos de células mesodérmicas: músculo, células notocordales y células cardíacas (fig. 3-19).

El laboratorio de John Gurdon ha mostrado que estas células del casquete animal responden a la activina debido a que modifican la expresión de genes específicos (fig. 3-20; Gurdon y col. 1994, 1995). Gurdon y col. colocaron bolitas liberadoras de activina o bolitas control en "emparedados" de células de casquete animal de *Xenopus*. Encontraron que las células expuestas a escasa o nula cantidad de activina fallaban en expresar cualquiera de los genes asociados con los tejidos mesodérmicos; estas células se diferenciaban en ectodermo. Altas concentraciones de activina encendían los genes tales como *Brachyury*, que es responsable de la instrucción de las células para convertirse en mesodérmicas. Concentraciones todavía más altas de activina provocaban que las células expresaran genes tales como *goosecoid*, que están asociados con las estructuras mesodérmicas más dorsales, la notocorda. La expresión de los genes *Brachyury* y *goosecoid* ha sido correlacionada con el número de receptores de activina sobre cada célula que están unidos por activina. Cada célula tiene cerca de 500 receptores de activina. Si se unen cerca de 100 de ellos, es activada la expresión de *Brachyury* y el tejido se convierte en mesodermo ventrolateral, como las células sanguíneas y del tejido conectivo. Si cerca de 300 de estos receptores son ocupados, las células encienden el gen *goosecoid* y se diferencian en tipos celulares de mesodermo más dorsal, como la notocorda (fig. 3-20D; Dyson y Gurdon 1998; Shimizu y Gurdon 1999).

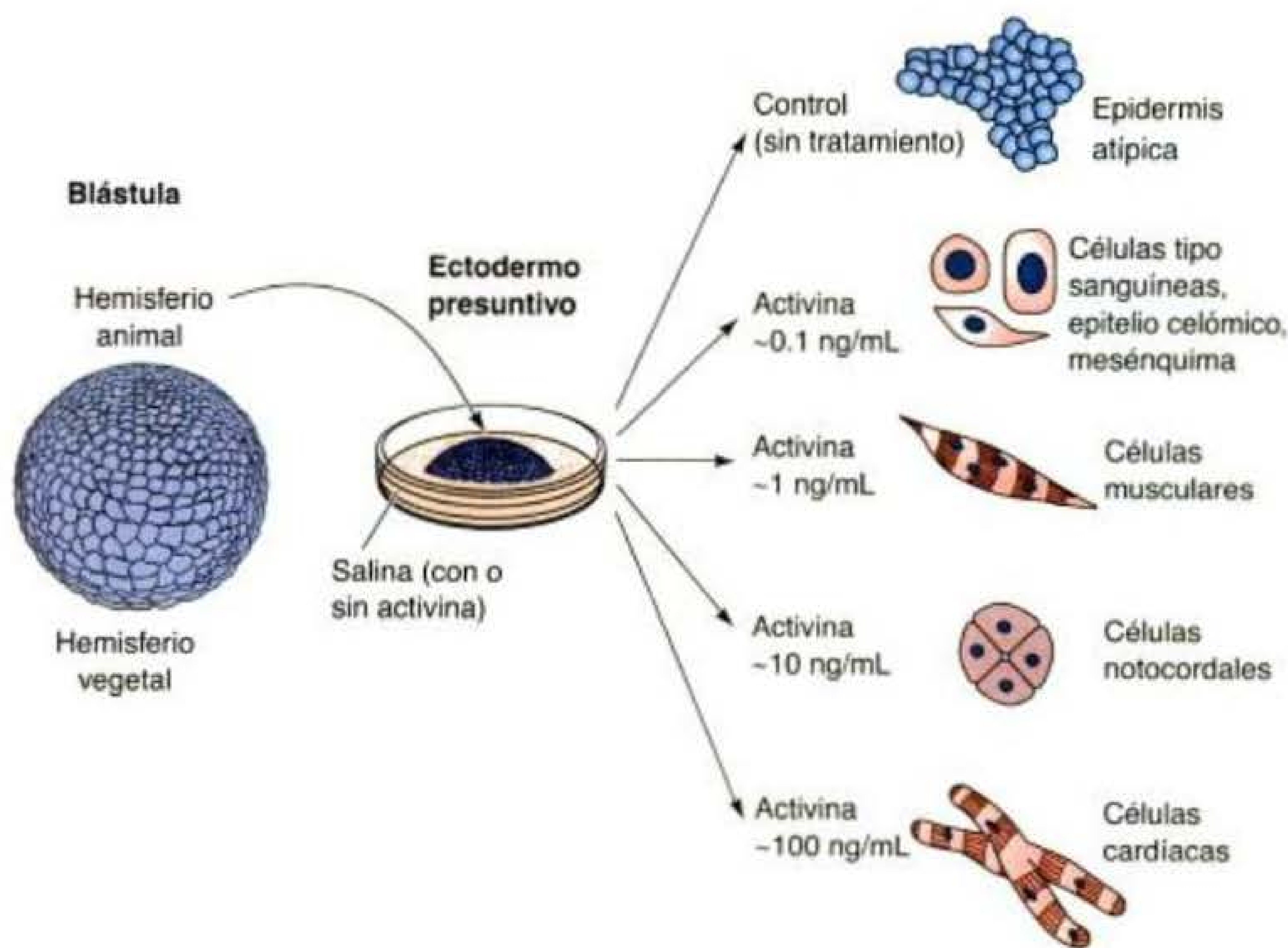
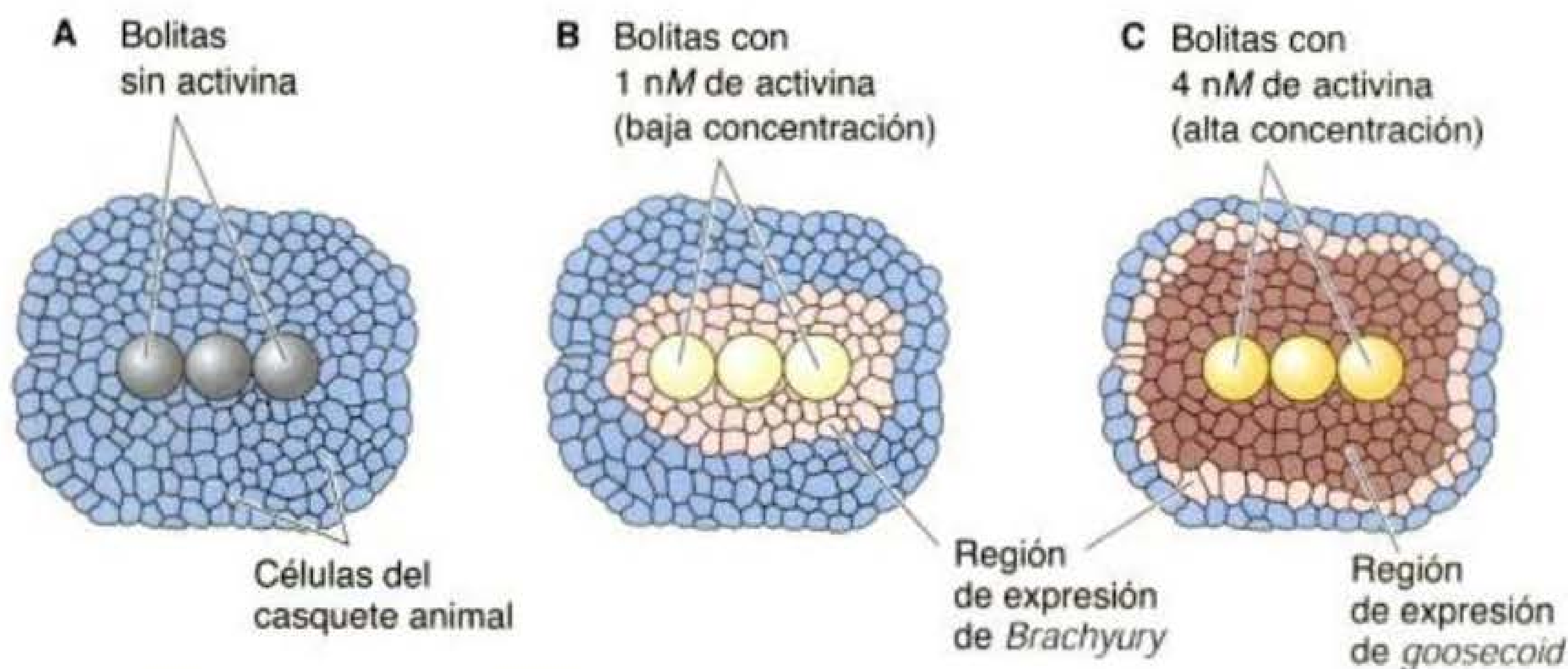


Fig. 3-19. Se piensa que la activina (o una proteína estrechamente relacionada, como Nodal) es la responsable de convertir las células del hemisferio animal en mesodermo. Cuando las células del casquete animal fueron quitadas de la blástula de *Xenopus* y colocadas en solución salina con activina, la activina a diferentes concentraciones confirió diferentes destinos sobre las células. (Según Fukui y Asashima 1994.)



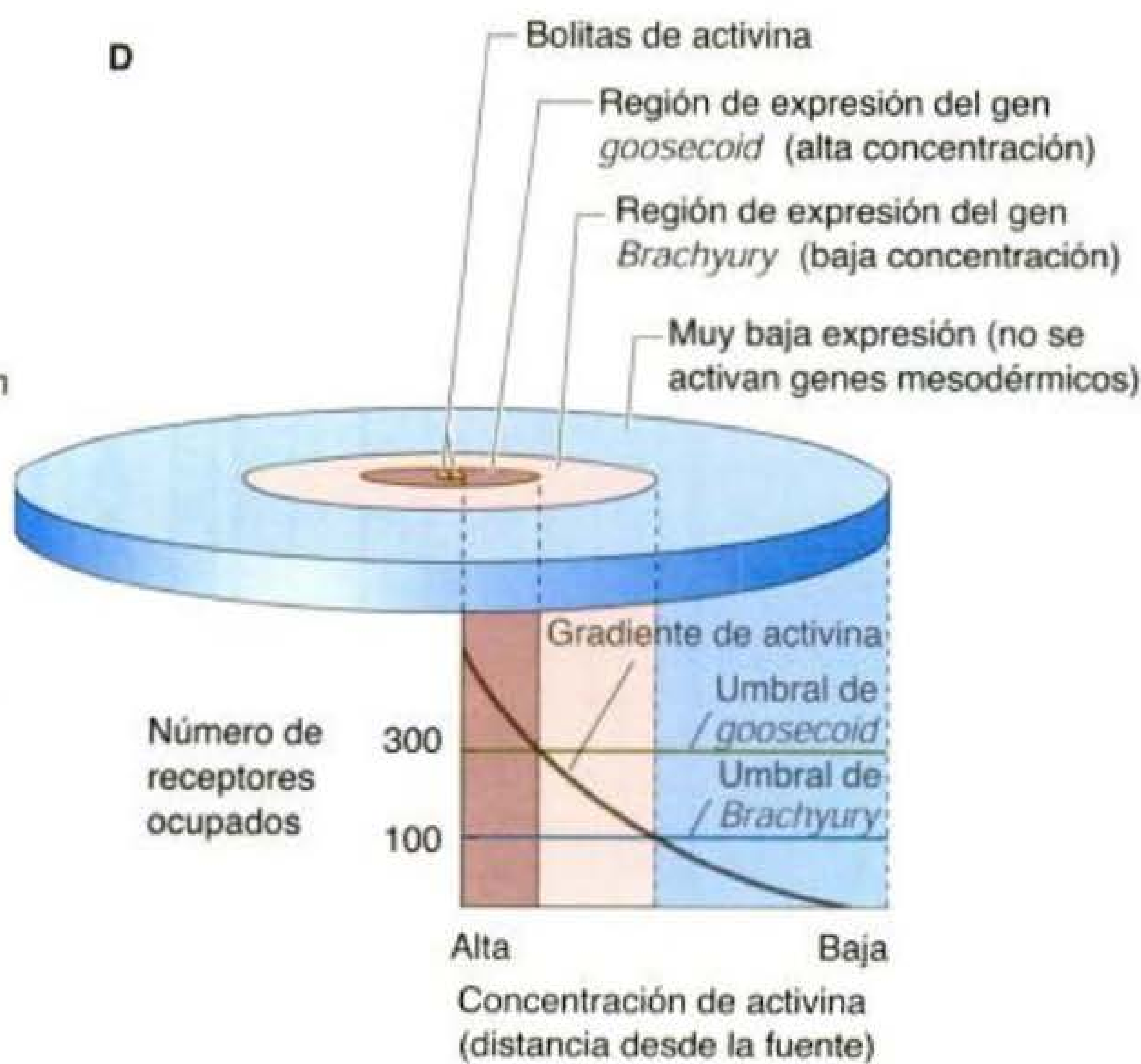


Fig. 3-20. Un gradiente de activina causa una expresión de genes diferente en las células del casquete animal en *Xenopus.* Los mRNA de los genes *Brachyury* y *goosecoid* pueden ser monitoreados mediante técnicas de hibridación como las que serán discutidas en el siguiente capítulo. Las células con estos mRNA aparecen más oscuras que las que no los están expresando. Bolitas con activina inducen la expresión (transcripción de mRNA) del gen *Brachyury* a distancia de las bolitas retiradas. **A.** Las bolitas que no contienen activina no provocan la expresión del gen *Brachyury.* **B.** Bolitas con activina 1 n*M* provocan la expresión del gen *Brachyury* cerca de éstas.
C. Bolitas con activina 4 n*M* permitieron la expresión del gen *Brachyury* varios diámetros celulares distantes de éstas. Sin embargo, la expresión de *goosecoid* fue vista donde la concentración de activina era más elevada, cerca de la fuente. Por lo tanto, es aparente que la expresión del gen *Brachyury* es inducida por concentraciones específicas de activina, y que *goosecoid* es inducido por altas concentraciones de activina. **D.** Interpretación del gradiente de activina por las células del casquete animal de *Xenopus.* Altas concentraciones de activina activan al gen *goosecoid,* mientras que las concentraciones más bajas activan al gen *Brachyury.* Este patrón se correlaciona con el número de receptores de activina ocupados en las células individuales. Parece existir un valor umbral que determina si la célula expresará *goosecoid, Brachyury* o ningún gen. (**A–C** Según Gurdon y col. 1994, 1995; **D** Según Gurdon y col. 1998.)

Información adicional y especulaciones

Reglas de la evidencia II

La ciencia es tanto la conclusión que algo *es* así como la conclusión que algo *no es*. La ciencia es solamente buena cuando usa controles para decirnos que algo no es, y la diferencia entre la ciencia y la no ciencia es generalmente una cuestión de controles. Solo porque un componente específico provoque en las células de la misma población la diferenciación en tipos celulares específicos, no significa que sea un morfógeno.

En *La aventura de Peter el negro*, Sherlock Holmes comentó, "Uno debe buscar siempre una alternativa posible y tomar precauciones contra ésta." ¿Qué otras posibilidades deben ser consideradas además de la hipótesis del morfógeno? Se espera que un morfógeno sea una molécula difusible que actúe a modo de gradiente de concentración. Sin embargo, hay al menos otras dos posibilidades además de la del gradiente para explicar el fenómeno por el cual las células parecen diferenciarse con relación a su proximidad a una fuente de activina. En primer lugar, podría haber una cascada de inducciones. Solamente la activina en altas concentraciones puede inducir a las células cercanas y no tiene efecto a bajas concentraciones. En su lugar, las células inducidas podrían dar comienzo a una segunda señal que induce al siguiente grupo de células, y estas células podrían dar comienzo a una tercera señal local, y así sucesivamente. Tal secuencia de eventos es a veces denominada una cascada de amplificación de relevos. En segundo lugar, las células cerca de la fuente de activina podrían responder no solo por diferenciación, sino migrando lejos a una posición distante dentro del tejido que respondía (o por producir células hijas que migran). Cuanto más fuerte es la señal, más lejana es la posición a la que podrían migran las células inducidas o sus células hijas.

Gurdon y col. (1994) hicieron controles para estas posibilidades alternativas. En primer lugar, para distinguir si los efectos de la activina eran debidos a la difusión pasiva de la activina o a su cascada de amplificación de relevo, colocaron células que no respondían (esto es, células que no son competentes para responder a la activina) entre la fuente de activina y las células del casquete animal que responden. Si la activina actúa a través de una cascada de amplificación de relevo, las células del casquete animal no deberían expresar *Brachyury*, debido a que la cascada habría estado interrumpida por las células intervinientes. Sin embargo, si la activina produjo sus efectos a través de un gradiente de concentración, las células del casquete animal deberían responder basadas en su distancia de la fuente de activina, incluso si las células entre ellas y la fuente no pudiesen responder. En este experimento, se encontró que las células del casquete animal expresaban *Brachyury*, aun cuando las células más cercanas a la fuente de activina no podrían responder a ésta.

En segundo lugar, los investigadores hicieron controles para los desplazamientos celulares mediante la inyección en las células del casquete animal (las células que responden) de colorante verde y pusieron a estas células verdes entre las células vegetales (que secretan activina) y las células del casquete animal inyectadas con rodamina (colorante rojo). Si había migración de las células que respondían o de su progenie, entonces las células verdes deberían ser vistas entre las células rojas. Nada de esto fue encontrado. Sin embargo, se observó que la división celular y el desplazamiento no son factores críticos. Esto se llevó a cabo colocando conjugados del casquete animal con células vegetales en un medio con citocalasina, un inhibidor del desplazamiento y la división celulares. La expresión del gen *Brachyury* (el gen expresado a baja concentraciones de activina, pero no a altas concentraciones) fue observada varios diámetros alejada de la fuente de activina, aun cuando el desplazamiento y la división celulares habían sido suprimidos.

Estos controles son **controles negativos** debido a que les dicen al investigador cuál *no* es la respuesta correcta. Cualquier investigación científica tiene que tener tales controles; cuando no se realizan, la investigación es sospechosa. Por ejemplo, un grupo de investigadores publicó un artículo afirmando que una particular estructura parecida a un gusano fue hallada en el útero de una mujer con una enfermedad específica. Sin embargo, no se mencionaron controles. Cuando otros científicos leyeron la publicación científica original, observaron que los controles obvios –buscar la estructura parecida a un gusano en el útero de las mujeres *sin* enfermedad– no fueron informados. Resultó que la estructura es una entidad común en la mayoría de los úteros y no fue asociada con la enfermedad.

Del mismo modo, cuando los científicos inyectaron un anticuerpo específico en un embrión para ver si inhibe un fenómeno específico, inyectaron en otros embriones como controles negativos anticuerpos no relacionados. Esta práctica muestra que la inhibición de los acontecimientos no es el resultado del solvente que es inyectado junto con el anticuerpo, de la presencia de la proteína de anticuerpo no específica o del hecho mismo de la inyección.

Además de los controles negativos, los experimentos deberían también incorporar controles positivos. Los **controles positivos** les dicen a los científicos que sus técnicas funcionan y que están evaluando lo que ellos piensan que están evaluando. Los controles positivos para los experimentos del gradiente de concentración de activina deberían exponer tejido que responde a concentraciones conocidas de activina y observar un cambio en la expresión de genes como resultado de las concentraciones aumentadas de activina; esto podría revelar a los investigadores que sus técnicas funcionan y que sus células pueden responder a la activina. Esto significa que los resultados negativos no son debidos a imperfecciones en los métodos. Estos experimentos fueron hechos (Green y Smith 1990; McDowell y col. 1997), y sus resultados apoyan la conclusión que las células responden en efecto a las disminuciones de la concentración de activina cuanto más lejos están de su fuente.

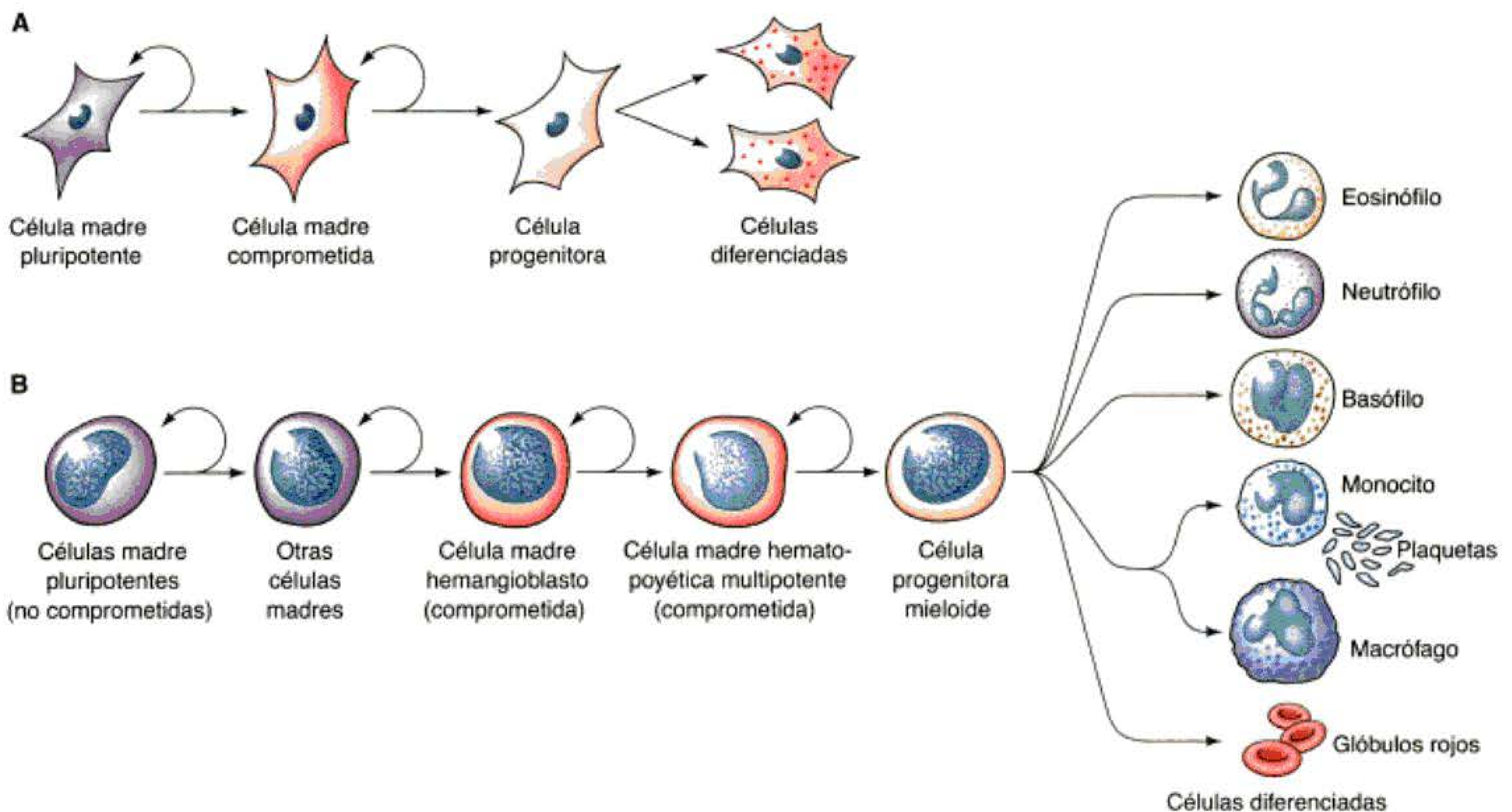


Fig. 3-21. Concepto de célula madre. **A.** Vista generalizada de la cascada a partir de la célula madre pluripotente pasando por la célula madre comprometida, luego por la célula progenitora, hasta la célula diferenciada. Cuando una célula madre se divide forma una célula más comprometida y otra célula madre. **B.** Ejemplo de formación de células sanguíneas basado en el esquema superior. (Según National Institutes of Health 2001.)

CAMPOS MORFOGENÉTICOS. Una de las ideas más interesantes arribadas a la embriología experimental ha sido la del **campo morfogenético**. Un campo morfogenético puede describirse como un grupo de células cuya posición y destino son especificados con respecto al mismo grupo de límites (Weiss 1939; Wolpert 1977). El destino general de un campo morfogenético está determinado; por esta razón, un campo específico de células dará origen a su órgano específico (extremidad anterior, ojo, corazón, etc.) aun cuando sea trasplantado a diferentes partes del embrión. Sin embargo, las células individuales *dentro* de un campo no están comprometidas, y las células de un campo pueden regular sus destinos para compensar las células que faltan del campo (Huxley y de Beer 1934; Opitz 1985; De Robertis y col. 1991). Sin embargo, como describimos antes (p. ej., para el caso de las células presuntivas de la pata de *Drosophila* transportadas a la región distal del campo presuntivo de la antena), si las células de un campo son colocadas dentro de otro campo, pueden utilizar las señales posicionales de su nueva localización, incluso si retienen su compromiso específico de órgano.

El campo morfogenético ha sido referido como una "organización de campo" (Spemann 1921) y como un "ecosistema celular" (Weiss 1923, 1939). La metáfora ecosistema es bastante apropiada en los estudios recientes que han mostrado que hay redes de interacciones entre las células en diferentes regiones de un campo morfogenético.

SITIO WEB 3.4 **"Redescubrimiento" del campo morfogenético ("Rediscovery" of the morphogenetic field).** El campo morfogenético fue uno de los conceptos más importantes de la embriología durante el comienzo del siglo XX. Este concepto fue eclipsado por la investigación sobre el papel de los genes en el desarrollo, pero se está volviendo a "descubrir" como consecuencia de esos estudios genéticos de desarrollo.

Células madre y compromiso

Uno de los principios importantes derivados de la especificación condicional es el concepto de células madre (National Institutes of Health 2001). Las **células madre** son células que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente y que pueden dar origen a células más especializadas. Cuando se dividen, las células madre producen un tipo de célula más especializada *y además* generan más células madre (fig. 3-21A).

Algunas células madre individuales son capaces de generar todas las estructuras del embrión. Estas células, denominadas **células madre pluripotentes**,* pueden generar ectodermo, mesodermo y células germinales. Así como dan origen a más células madre pluripotentes, también generan **células madre comprometidas**. Las células madre comprometidas pueden dar origen a una pequeña población de células. Por ejemplo, un tipo de célula madre comprometida (el hemangioblasto) da

* Hay además células madre denominadas células madre *totipotentes* y serán discutidas en los capítulos 11 y 21. Las *células madre totipotentes* son aquellas células muy tempranas de mamífero que pueden formar al embrión entero y a la placenta fetal (trofoblasto) que se dispone alrededor de éste. Las *células madre pluripotentes* de mamíferos pueden formar el embrión, pero no a los tejidos de sus alrededores.

origen a todos los vasos sanguíneos, células sanguíneas y linfocitos. Otro tipo de célula madre comprometida, la célula madre mesenquimática, puede dar origen a la totalidad de los diferentes tejidos conectivos (cartílago, músculo, adiposo, etc.). Las células madre comprometidas pueden originar a células madre comprometidas más específicamente (como las células madre que generan únicamente células sanguíneas y linfocitos, no vasos sanguíneos) o éstas pueden generar lo que se denominan células progenitoras (fig. 3-21B).

Las **células progenitoras**, también denominadas **células precursoras**, no son más células madre debido a que sus divisiones no crean otra célula progenitora similar. En su lugar, la célula progenitora se divide para formar uno o pocos tipos celulares relacionados, dependiendo del ambiente celular en el que se encuentre. Por ejemplo, hay un precursor celular sanguíneo (la célula progenitora mieloide) que puede generar todos los tipos diferentes de células sanguíneas. Generalmente, la célula progenitora muestra alguna evidencia de diferenciación, pero el proceso no se completa hasta que se ha formado la célula diferenciada.

La restricción del potencial de la célula madre es gradual y los potenciales de estas células están determinados por su entorno. Una vez comprometidas, sin embargo, generalmente no cambian su compromiso. Cuando se colocan en un nuevo ambiente, no cambiarán el tipo de células que generan. Las células madre son críticas para mantener poblaciones celulares que sobreviven períodos prolongados y que deben ser renovadas. Debido a esto, son importantes para nuestra producción continua de células de la sangre, del pelo, de la epidermis y del epitelio intestinal.

Especificación sincitial

Muchos insectos también utilizan un tercer medio, conocido como **especificación sincitial**, para comprometer a las células a sus destinos. En este caso, las interacciones no se producen entre las células, sino entre las partes de una célula. En los embriones tempranos de estos insectos, la división celular no es completa. En su lugar, los núcleos se dividen dentro del citoplasma del huevo (sería una célula huevo, debido a que el gameto femenino ya fue fecundado), produciendo muchos núcleos dentro de una gran célula huevo. Un citoplasma que contiene muchos núcleos es denominado **sincitio**. El citoplasma del huevo (gameto femenino), sin embargo, no es uniforme. En su lugar, el citoplasma anterior del huevo (gameto femenino) es significativamente diferente del posterior.

En la mosca de la fruta, por ejemplo, la porción más anterior del huevo (gameto femenino) contiene un mRNA que codifica una proteína denominada Bicoid. La porción más posterior del huevo (gameto femenino) contiene un mRNA que codifica una proteína denominada Nanos. Cuando el huevo (gameto femenino) es puesto y fecundado, estos dos mRNA son traducidos a sus proteínas respectivas. La concentración de la proteína Bicoid es más alta en el extremo anterior y disminuye hacia el posterior; la proteína Nanos está más elevada en el extremo posterior y disminuye como si ésta se difundiese anteriormente. Debido a esto, el eje longitudinal del huevo (gameto femenino) de *Drosophila* es abarcado por dos gradientes de morfógenos opuestos: uno de la proteína Bicoid viniendo del extremo anterior, y el otro de la proteína Nanos viniendo del extremo posterior. Las proteínas Bicoid y Nanos forman un sistema coordinado basado en sus proporciones, de modo tal que cada región del embrión es distinguida por una proporción diferente de dos proteínas. Como los núcleos se dividen y entran en distintas regiones del citoplasma del huevo (célula huevo), serán instruidos en su posición a lo largo del eje anteroposterior por estas proporciones. Los núcleos de las regiones que contienen cantidades elevadas de Bicoid y poco de Nanos serán instruidos a activar aquellos genes necesarios para la producción de la cabeza. Los núcleos

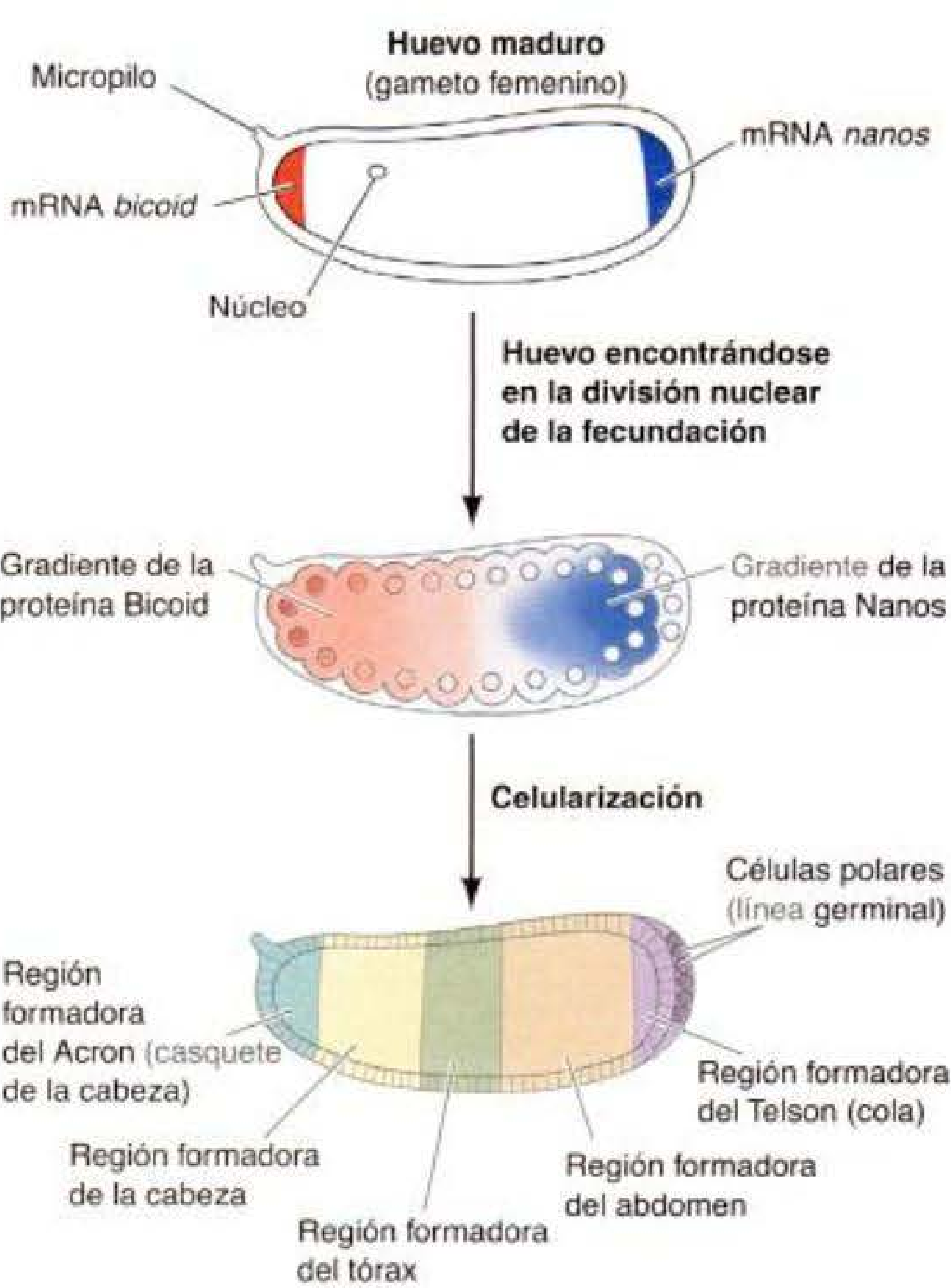


Fig. 3-22. Especificación sincitial en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La especificación anterior-posterior se origina a partir de gradientes de morfógeno presentes dentro del citoplasma del huevo. El mRNA *bicoid* es estabilizado en la parte más anterior del huevo, mientras que el mRNA *Nanos* es amarrado al extremo posterior. (El extremo anterior puede ser reconocido por el micropilo de la envoltura; esta estructura le permite el ingreso al espermatozoide.) Cuando el huevo (gameto femenino) es puesto y fecundado (célula huevo), estos dos mRNA se traducen en proteínas. La proteína Bicoid forma un gradiente que es más alto en el extremo anterior, y la proteína Nanos forma un gradiente que es más alto en su extremo posterior. Estas dos proteínas forman un sistema coordinado basado en sus proporciones. Cada posición a lo largo del eje es de este modo distinguida de cualquier otra posición. Cuando se produce una división nuclear, a cada núcleo se le da una información posicional por la proporción de estas proteínas. Las proteínas formadoras de este gradiente activan la transcripción de los genes que especifican la identidad del segmento de la larva y de la mosca adulta.

de regiones con un poco menos de Bicoid pero con una pequeña cantidad de Nanos serán instruidos a activar aquellos genes que generan el tórax. Los núcleos de regiones en las que hay muy poco o nada de Bicoid y gran cantidad de Nanos serán instruidos a formar las estructuras abdominales (fig. 3-22; Nüsslein-Volhard y col. 1987). Los mecanismos de especificación sincitial serán detallados en el capítulo 9.

Ningún embrión utiliza únicamente para especificar a las células los mecanismos de especificación autónoma, condicional, o sincitial. Se encuentra especificación autónoma aun en un "embrión regulativo" como el erizo de mar, y en el sistema nervioso y en algunas musculaturas del tunicado que se "desarrollan autónomamente" se ha demostrado que se originan a partir de interacciones regulativas entre sus células. Los insectos como *Drosophila* utilizan los tres modos de especificación para comprometer sus células a destinos específicos. En capítulos posteriores se detallarán los mecanismos por los que los destinos celulares son comprometidos en estas especies.

Morfogénesis y adhesión celular

Un cuerpo es más que una colección de tipos celulares distribuidos azarosamente. El desarrollo involucra no solo la diferenciación de células, sino también su organización en disposiciones multicelulares, como tejidos y órganos. Cuando observamos la anatomía detallada de un tejido como la retina neural del ojo, podemos ver una complicada y precisa organización de muchos tipos de células. ¿Cómo hace la materia para organizarse a sí misma de modo tal que llega a crear una estructura compleja como un miembro o un ojo?

Hay cinco preguntas principales para los embriólogos que estudian la morfogénesis:

1. **¿Cómo se forman los tejidos a partir de una población de células?** Por ejemplo, ¿por qué las células de la retina se adhieren a otras células de la retina en lugar de llegar a integrarse con las células de la retina pigmentaria o del iris cercanas a ellas? ¿Cómo están organizados varios tipos celulares dentro de la retina (las tres capas diferentes de células de fotorreceptores, neuronas bipolares y células ganglionares) de modo tal que la retina es funcional?
2. **¿Cómo se construyen los órganos a partir de los tejidos?** La retina del ojo se forma a una distancia precisa detrás de la córnea y del cristalino. La retina no serviría de nada si ésta se desarrollara detrás de un hueso o en el centro del riñón. Además, los axones de las neuronas de la retina deben ingresar en el cerebro para inervar las regiones de la corteza cerebral que analizan la información visual. Todas estas conexiones deben ser ordenadas con precisión.
3. **¿Cómo se forman los órganos en una localización específica? y ¿cómo hacen las células en migración para alcanzar sus destinos?** El ojo se desarrolla únicamente en la cabeza y en ningún otro sitio. ¿Qué detiene la formación de un ojo en otras áreas del cuerpo? Algunas células –por ejemplo, los precursores de nuestras células pigmentarias, de las células germinales y de las células sanguíneas– deben viajar distancias muy largas hasta alcanzar sus localizaciones definitivas. ¿Cómo son instruidas las células para viajar a lo largo de ciertos recorridos en nuestros cuerpos embrionarios? y ¿cómo hacen para decir que deben detenerse una vez que han alcanzado sus localizaciones apropiadas?
4. **¿Cómo crecen los órganos y sus células? y ¿cómo se coordina su crecimiento a lo largo del desarrollo?** Si uno pretende poder llegar a ver, las células de todos los tejidos que conforman el ojo deben crecer de un modo coordinado. Algunas células, incluidas la mayor parte de las neuronas, no se dividen después del nacimiento. En contraste, el intestino está constantemente deshaciéndose de sus células y nuevas células intestinales son regeneradas cada día. El índice mitótico de cada tejido debe estar regulado cuidadosamente. Si el intestino generara más células que las que muda, esto podría producir crecimientos tumorales. Si éste produce menos células de las que muda, rápidamente dejaría de ser funcional. ¿Qué controla el índice mitótico del intestino?
5. **¿Cómo adquieren la polaridad los órganos?** Si uno mirase la sección transversal de los dedos, se podría ver un grupo organizado de tejidos: óseo, cartilaginoso, muscular, adiposo, de la dermis, de la epidermis, sanguíneo y nervioso. Mirando a través de una sección transversal del antebrazo, se puede encontrar el mismo grupo de tejidos. Pero éstos están organizados de modo muy diferente en las distintas partes del brazo (miembro anterior o superior). ¿Cómo es que los mismos tipos de células pueden organizarse en diferentes sentidos en las distintas partes de la misma estructura?

Todas estas preguntas involucran aspectos del comportamiento celular. En el embrión hay dos tipos principales de organizaciones celulares: **células epiteliales**, que están estrechamente conectadas entre sí en láminas o tubos, y **células mesenquimáticas**, que no se encuentran conectadas entre sí y que funcionan como unidades independientes. La morfogénesis se lleva a cabo mediante un limitado repertorio de variaciones en los procesos celulares dentro de estos dos tipos de organización: 1) dirección y número de divisiones celulares; 2) cambios en la forma celular; 3) movimientos celulares; 4) crecimiento celular; 5) muerte celular y 6) cambios en la composición de la membrana celular o de los productos secretados. Aquí se discutirá la última de estas consideraciones.

SITIO WEB 3.5 **Cómo funcionan los comportamientos morfogenéticos (How morphogenetic behaviors work).** Aunque el repertorio de comportamientos morfogenéticos es pequeño, las células pueden hacer mucho con este limitado grupo de instrucciones. Este sitio web ilustra los cambios epiteliales y mesenquimáticos que llevan a cabo el desarrollo.

Afinidad celular diferencial

Muchas de las respuestas a nuestras preguntas sobre la morfogénesis involucran a las propiedades de la superficie celular. La superficie celular se parece bastante en todos los tipos celulares, y muchos de los primeros investigadores pensaron que la superficie celular no era

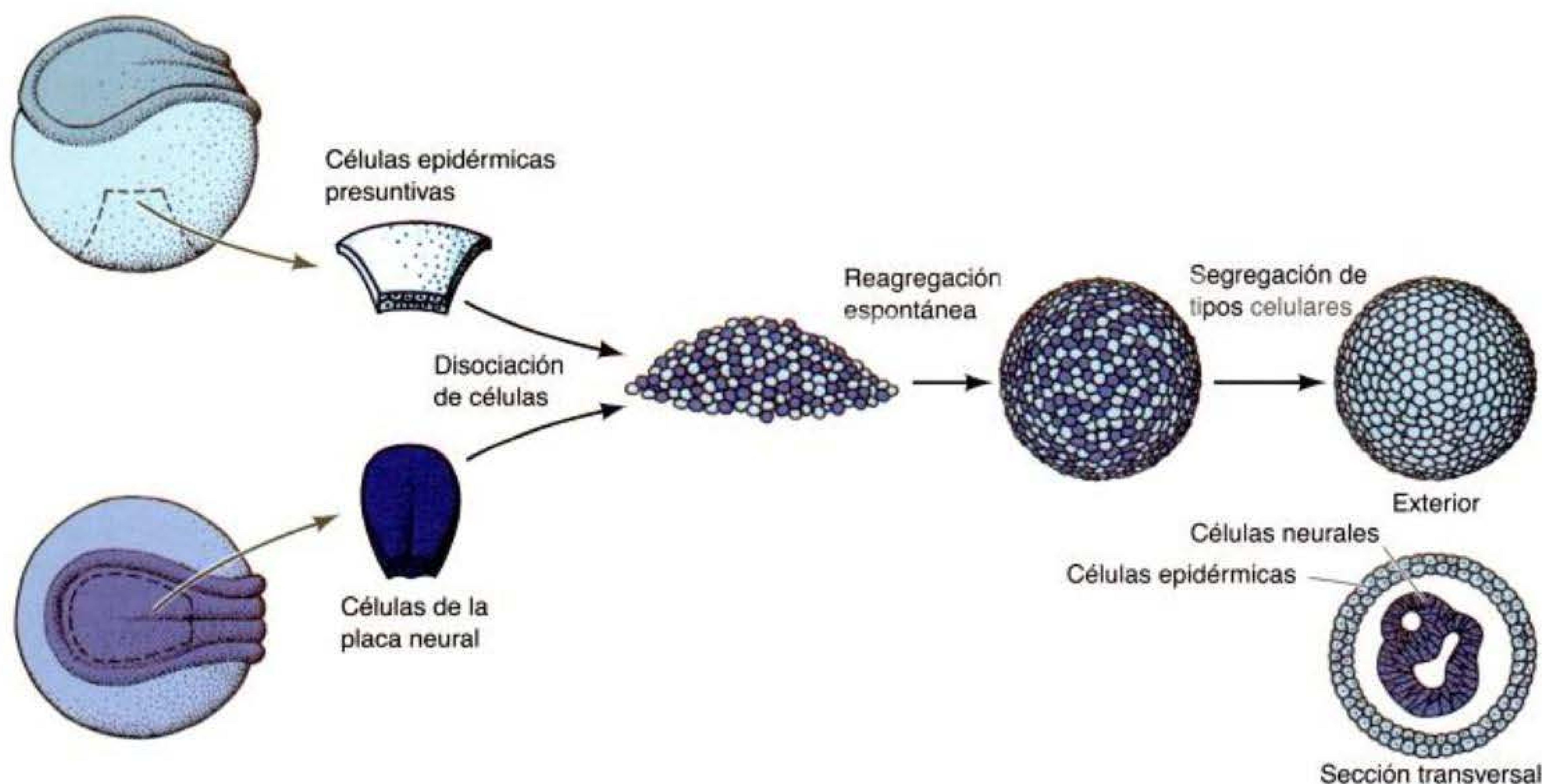


Fig. 3-23. Reagregación de células de néurula de anfibio. Las células epidérmicas presuntivas de los embriones pigmentados y las células de la placa neural de los embriones no pigmentados son disociadas y mezcladas juntas. Las células se reagregan de modo tal que un tipo (aquí, la presuntiva epidermis) cubre a otro. (Según Townes y Holtfreter 1955.)

una parte viva de la célula. Ahora sabemos que cada tipo de célula tiene un grupo diferente de proteínas sobre su superficie, y que algunas de estas diferencias son responsables de la formación de estructuras de tejidos y órganos durante el desarrollo. Las observaciones hechas por E. E. Just (1939) sobre fecundación y desarrollo embrionario temprano sugirieron que la membrana celular difería entre los distintos tipos celulares, pero los análisis modernos de morfogénesis comenzaron con los experimentos de Townes y Holtfreter en 1955. Aprovechando el descubrimiento de que los tejidos de anfibio llegan a disociarse en células individuales cuando son colocados en soluciones alcalinas, prepararon suspensiones celulares individuales de cada una de las tres capas germinales de los embriones de anfibio poco después que el tubo neural se había formado. Dos o más de estas suspensiones de células individuales fueron combinadas en varios sentidos. Cuando el pH de la solución estaba normalizado, las células se adherían entre sí, formando agregados sobre las placas de Petri cubiertas de agar. Utilizando embriones de especies que tenían células de diferentes colores y tamaños, Townes y Holtfreter pudieron seguir el comportamiento de las células recombinadas (fig. 3-23).

Los resultados de sus experimentos fueron sorprendentes. Primero, encontraron que las células reagregadas llegaban a estar espacialmente segregadas. Es decir, los dos tipos celulares en lugar de continuar mezclados, se separaban cada uno de ellos en su propia región. De este modo, cuando las células epidérmicas (ectodérmicas) y las células mesodérmicas son reunidas para formar un agregado mezclado, las células epidérmicas se mueven hacia la periferia del agregado y las células mesodérmicas se mueven hacia el interior. En ningún caso las células recombinadas se mantienen mezcladas azarosamente, y en la mayoría de los casos, un tipo de tejido envuelve completamente al otro.

Segundo, los investigadores encontraron que las posiciones finales de los reagregados celulares reflejan sus posiciones embrionarias. Las células mesodérmicas migran centralmente con respecto a la epidermis, adhiriéndose a la superficie epidérmica interna (fig. 3-24A). El mesodermo también migra centralmente con respecto al intestino o endodermo (fig. 3-24B). Sin embargo, cuando las tres capas germinales son mezcladas juntas, el endodermo se separa del ectodermo y del mesodermo y luego es envuelto por éstos (fig. 3-24C). En la configuración final, el ectodermo está en la periferia, el endodermo es interno y el mesodermo se localiza en la región entre ellos. Holtfreter interpretó este hallazgo en términos de **afinidad selectiva**. La superficie interna del ectodermo tiene afinidad positiva para las células del mesodermo y afinidad negativa para las del endodermo, mientras que el mesodermo tiene afinidades positivas para las células ectodérmicas y endodérmicas. La imitación de la estructura embrionaria normal mediante agregados de células se observa también en la recombinación de células de epidermis y de la placa neural (figs. 3-23 y 3-24D). Las células de la epidermis presuntiva migran a la periferia como en el caso anterior; las células de la placa neural migran hacia adentro, formando una estructura similar al tubo neural. Cuando las células del mesodermo axial (notocorda) son incorporadas a la suspensión de células presuntivas epidérmicas y neurales, la segregación da origen a una capa epidérmica externa, una de tejido neural localizado centralmente y una capa de tejido mesodérmico entre ellas (fig. 3-24E). De algún modo, las células pueden segregarse en sus posiciones embrionarias adecuadas.

Estas afinidades selectivas fueron también observadas por Boucaut (1974), quien inyectó a células individuales de las capas germinales específicas en la cavidad

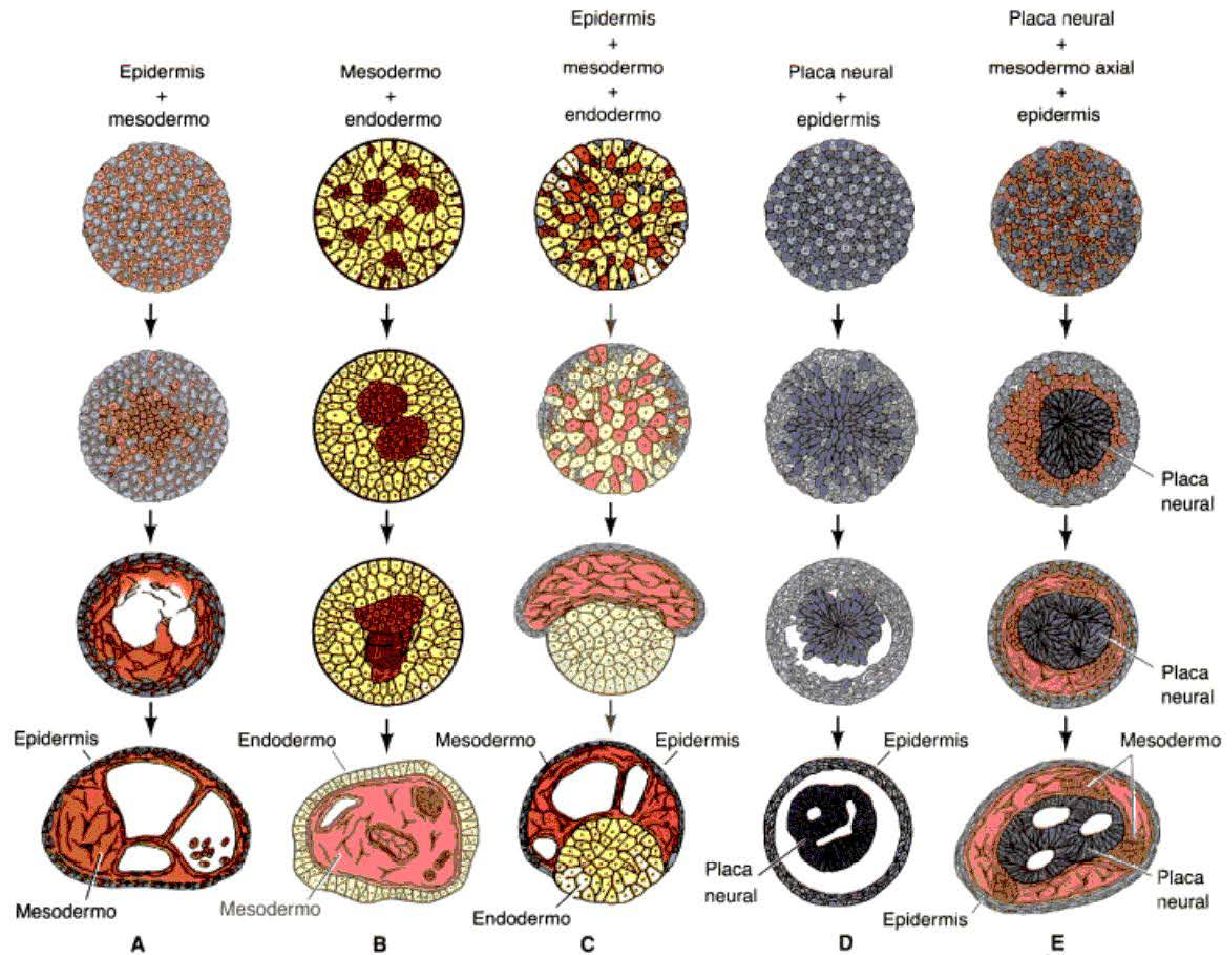


Fig. 3-24. Segregación y reconstrucción de relaciones espaciales en agregados de células de embriones de anfibios. (Según Townes y Holtfreter 1955.)

corporal de la gástrula de anfibio. Encontró que estas células migraban dorsalmente hasta sus capas germinales apropiadas. Las células endodérmicas encontraron posiciones en el endodermo del huésped, mientras que las células ectodérmicas solo fueron halladas en el ectodermo del huésped. Por esta razón, la afinidad selectiva parece ser importante para conferir información posicional a las células embrionarias.

La tercera conclusión de Holtfreter y sus colegas fue que la afinidad selectiva cambia durante el desarrollo. Estos cambios pueden ser esperados, debido a que las células embrionarias no conservan una única relación estable con otros tipos celulares. Para que el desarrollo se produzca, las células deben interactuar recíprocamente de modo diferente con otras poblaciones celulares en momentos específicos. Estos cambios en la afinidad celular son extremadamente importantes en el proceso de morfogénesis.

La reconstrucción experimental de agregados de células de embriones tardíos de aves y mamíferos fue llevada a cabo mediante el uso de la proteasa tripsina para poder disociar a las células entre sí (Moscona 1952). Cuando las células individuales resultantes eran mezcladas juntas en un frasco y puestas a girar de modo tal que la fuerza de corte rompiera cualquier adhesión inespecífica, las células se separaban entre sí de acuerdo a su tipo celular. Al hacerlo, ellas reconstruyeron la organización del tejido original (Moscona 1961; Giudice y Just 1962). La figura 3-25 muestra la "reconstrucción" de tejido de la piel de un embrión de ratón de 15 días. Las células epidérmicas fueron separadas mediante enzimas proteolíticas y luego agregadas en un cultivo rotatorio. Las células epidérmicas de cada agregado migraban hacia la periferia, y las células de la dermis migraban hacia el centro. A las 72 horas, la epidermis había sido reconstruida, se había formado una capa de queratina y las interacciones entre los tejidos formaron folículos pilosos en la región dérmica. Esta reconstrucción de tejidos complejos a partir de células individuales es denominada **agregación histotípica**.

Modelo termodinámico de las interacciones

Las células, entonces, no se separan azarosamente, sino que pueden moverse activamente creando una organización tisular. ¿Cuáles son las fuerzas que dirigen el movimiento celular durante la morfogénesis? En 1964, Malcolm Steinberg propuso la **hipótesis de adhesión diferencial**, un modelo que buscaba explicar los patrones

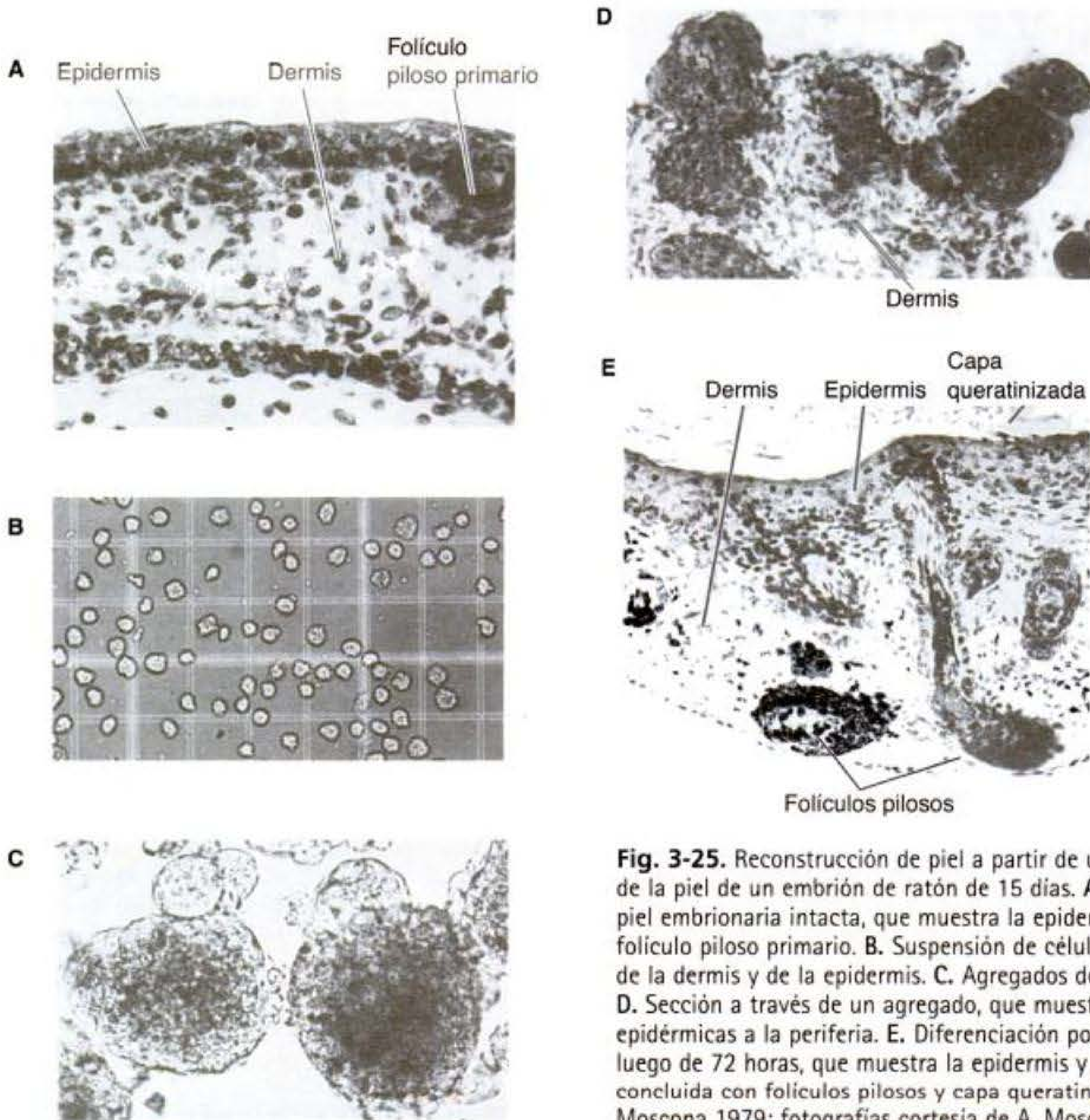


Fig. 3-25. Reconstrucción de piel a partir de una suspensión de células de la piel de un embrión de ratón de 15 días. **A.** Sección a través de la piel embrionaria intacta, que muestra la epidermis, la dermis y un folículo piloso primario. **B.** Suspensión de células de la piel individuales de la dermis y de la epidermis. **C.** Agregados después de 24 horas. **D.** Sección a través de un agregado, que muestra la migración de células epidérmicas a la periferia. **E.** Diferenciación posterior de los agregados luego de 72 horas, que muestra la epidermis y la dermis reconstituidas, concluida con folículos pilosos y capa queratinizada. (De Monroy y Moscona 1979; fotografías cortesía de A. Moscona.)

de segregación celular basado en los principios termodinámicos. Utilizando células derivadas de tejidos embrionarios tripsinados, Steinberg mostró que ciertos tipos celulares migran siempre de manera central cuando son combinados con algunos tipos celulares, pero migran de manera periférica cuando son combinados con otros. La figura 3-26 muestra las interacciones entre las células de la retina pigmentada y las células de la retina neural. Cuando una suspensión de células individuales de estos dos tipos celulares eran mezcladas juntas, formaba agregados de células organizadas azarosamente. Sin embargo, después de varias horas, ninguna de las células de la retina pigmentada eran vistas sobre la periferia de los agregados, y dos días más tarde, se observaban dos capas diferentes, con las células de la retina pigmentada localizadas internamente a las células de la retina neural. Además, estas interacciones forman una jerarquía (Steinberg 1970). Si la posición final de un tipo celular, A, es interna a un segundo tipo celular, B, y la posición final de B es interna a un tercer tipo celular, C, luego la posición final de A será siempre interna a C. Por ejemplo, las células de la retina pigmentada migran internamente a las células de la retina neural, y las células cardíacas migran internamente a las células de la retina pigmentada. Por lo tanto, las células cardíacas migran internamente a las células de la retina neural.

Estas observaciones llevaron a Steinberg a proponer que las células interactúan de modo tal que forman un agregado con la menor energía libre interfacial. En otras palabras, las células se reorganizan a sí mismas en el patrón termodinámicamente más estable. Si los tipos celulares A y B tienen diferentes fuerzas de adhesión, y si las fuerzas de los contactos A-A son mayores que la fuerza de los contactos A-B o B-B, se podría producir la separación, con las células A convirtiéndose en centrales. Por otra parte, si las fuerzas de los contactos A-A son menores o iguales que las fuerzas de contacto A-B, a continuación el agregado se mantendrá como una mezcla aleatoria de células. Por último, si las fuerzas de contacto de A-A son mayores que las fuerzas de contacto A-B –en otras palabras, si las células A y B esencialmente no muestran adhesividad entre sí– entonces las células A y B formarán agregados separados. De acuerdo con esta hipótesis, los embriones tempranos pueden ser vistos como existiendo en un estado de equilibrio hasta que algunas modificaciones en la actividad de los genes cambian las moléculas de superficie celular. Los movimientos que se originan buscan

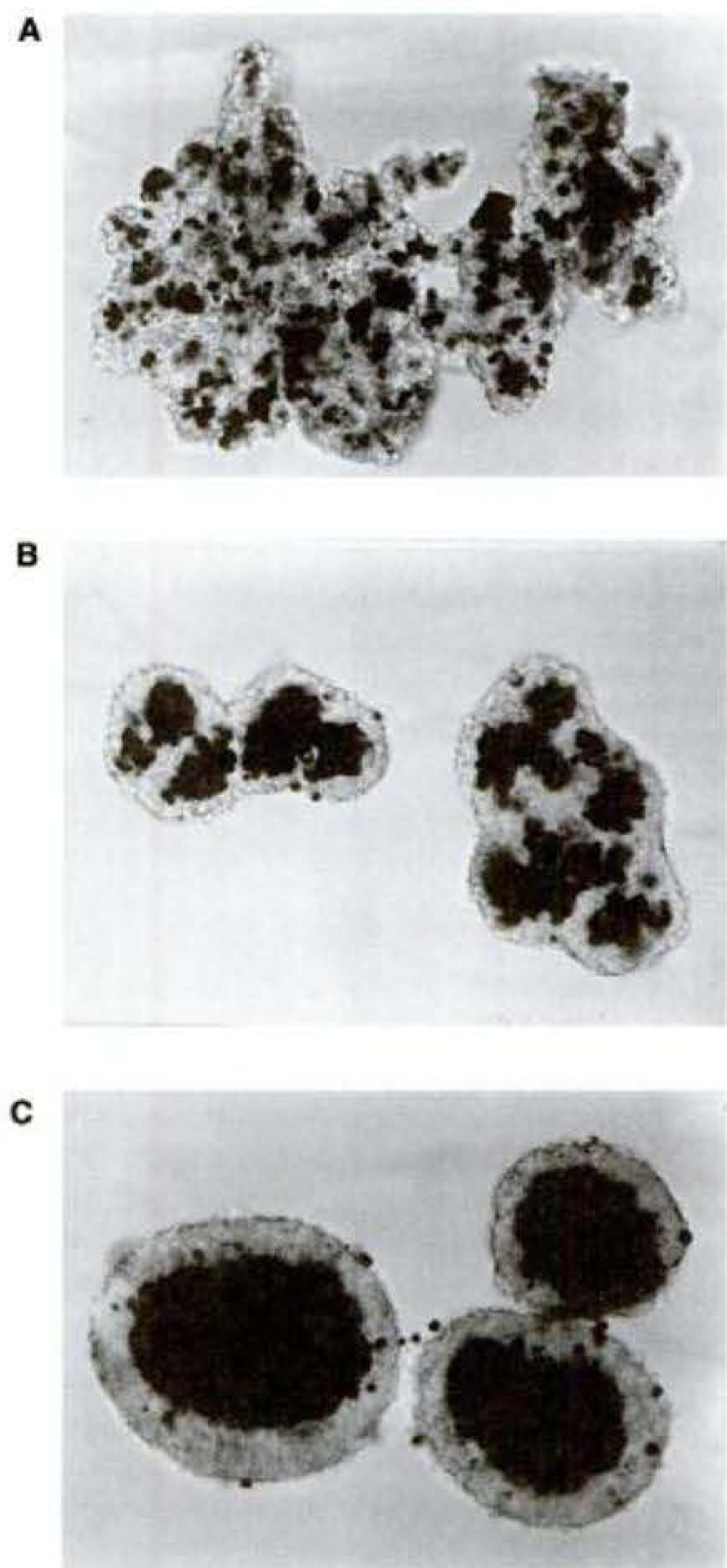


Fig. 3-26. Agregados formados por la mezcla de células de la retina neural (no pigmentada) con células de la retina pigmentada de un embrión de pollo de 7 días. A. Cinco horas después de que las suspensiones individuales de las células son mezcladas, se observan agregados de células distribuidas al azar. B. A las 19 horas, las células de la retina pigmentada no son vistas en la periferia. C. A los dos días, la gran mayoría de las células de la retina pigmentada está localizada en una masa interna central, rodeada por células de la retina neural. (Las células pigmentadas esparcidas son probablemente células muertas.) (De Armstrong 1989; fotografía cortesía de P. B. Armstrong.)

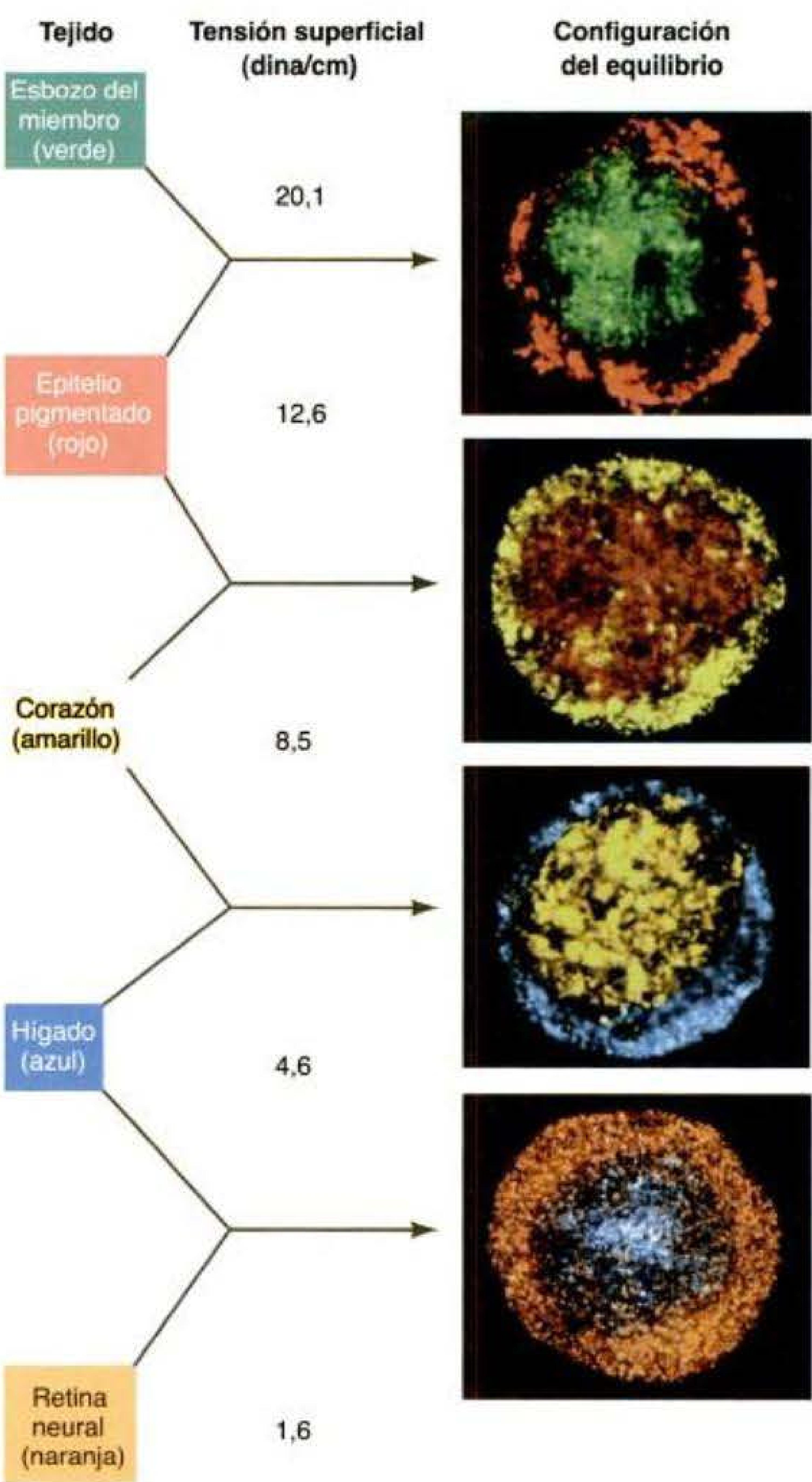


Fig. 3-27. Jerarquía de la segregación celular en relación con las tensiones superficiales decrecientes. La configuración de equilibrio refleja la resistencia de la cohesión celular, con los tipos celulares que tienen la mayor cohesión celular segregados dentro de las células con menor cohesión. Las imágenes fueron obtenidas por secciones de los agregados y asignación de colores por computadora a los tipos celulares. Las áreas negras representan a células cuya señal fue corregida fuera en el programa de optimización de imagen. (De Foty y col. 1996; fotografía cortesía de M. S. Steinberg y R. A. Foty.)

restituir en las células una nueva configuración de equilibrio. Esto es necesario para que la separación se produzca si todos los tipos celulares difieren en sus fuerzas de adhesión.

En 1996, Foty y col. en el laboratorio de Steinberg demostraron que éste era, de hecho, el caso: los tipos celulares que tenían la mayor cohesión superficial se separaban dentro de aquellos que tenían menor tensión superficial (fig. 3-27; Foty y col. 1996). En la forma más simple de este modelo, todas las células pueden tener el mismo tipo de "pegamento" sobre la superficie celular. La cantidad de este producto de superficie celular, o de arquitectura celular que permite a la sustancia ser distribuida diferencialmente a lo largo de la superficie, podía causar una diferencia en el número de contactos estables hechos entre los tipos celulares. En una versión más específica de este modelo, las diferencias termodinámicas pueden ser causadas por diferentes tipos de moléculas de adhesión (véase Moscona 1974). Cuando los estudios de Holtfreter fueron revisados utilizando técnicas modernas, Davis y col. (1997) encontraron que las tensiones superficiales de los tejidos de las capas germinales individuales eran precisamente aquellas requeridas para los patrones de separación observados in vitro e in vivo.

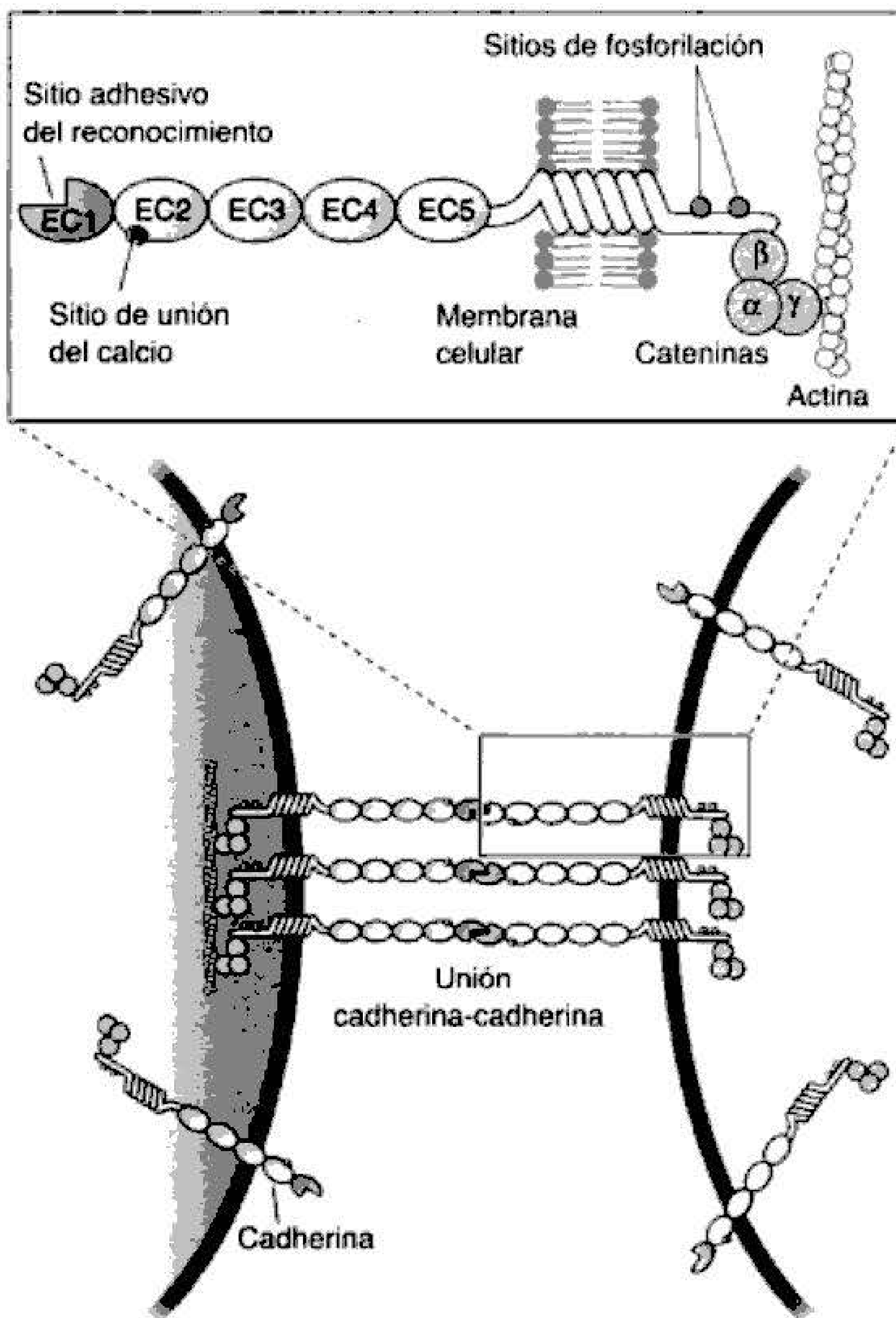


Fig. 3-28. Adhesión celular mediada por cadherina. Las cadherinas están asociadas con tres tipos de cateninas. Las cateninas pueden llegar a asociarse con el sistema de microfilamentos de actina del interior celular. (Según Takeichi 1991).

SITIO WEB 3.6 **Demostración del modelo termodinámico (Demonstrating the thermodynamic model).** La evidencia original in vivo para el modelo termodinámico de adhesión celular proviene de estudios de regeneración de la extremidad. Este sitio web entra en algunos detalles de estos experimentos y cómo son interpretados.

Cadherinas y adhesión celular

La evidencia reciente demuestra que los límites entre tejidos se pueden crear de hecho por diversos tipos celulares que tengan distintos tipos y diferentes cantidades de moléculas de adhesión celular. Varias clases de moléculas pueden mediar la adhesión celular, pero las **cadherinas** parecen ser las principales moléculas de adhesión.

Como su nombre lo sugiere, las cadherinas son moléculas de adhesión calcio-dependiente. Ellas son críticas para el establecimiento y mantenimiento de las conexiones intercelulares, y parecen ser decisivas para la segregación espacial de los tipos celulares y para la organización de la forma animal (Takeichi 1987). Las cadherinas interactúan con otras cadherinas sobre células adyacentes, y están ancladas a la célula mediante un complejo de proteínas denominadas **cateninas** (fig. 3-28). El complejo catenina-cadherina forma la clásica unión adherente que ayuda a conectar a las células epiteliales. Además, debido a que las cateninas se unen al citoesqueleto de la célula, se integran a las células epiteliales en una unidad mecánica. Fragmentos de anticuerpo univalente (Fab; véase cap. 2) contra las cadherinas convertirán un agregado histotípico tridimensional de células en una sola capa de células (Takeichi y col. 1979).

En embriones de vertebrados, se han identificado varias clases principales de cadherinas:

- La **cadherina-E** (cadherina epitelial, también denominada uvomorulina y L-CAM) es expresada en todas las células de embriones tempranos de mamíferos, incluso en el estado de cigoto. Posteriormente, esta molécula es restringida a los tejidos epiteliales de los embriones y adultos.
- La **cadherina-P** (cadherina placentaria) aparece expresada primariamente en las células trofoblásticas (aquellas células placentarias de los embriones de mamíferos que contactan la pared uterina) y sobre el epitelio de la pared uterina (Nose y Takeichi 1986). Es posible que la cadherina-P facilite la conexión del embrión al útero, debido a que se ha visto que la cadherina P sobre las células uterinas contacta con la cadherina-P de las células trofoblásticas del embrión de ratón (Kadokawa y col. 1989).
- La **cadherina-N** (cadherina neural) es vista primero en las células mesodérmicas en el embrión gastrulando debido a que pierden su expresión de cadherina-E. También se expresa significativamente sobre las células del sistema nervioso central en desarrollo (Hatta y Takeichi 1986).
- La **cadherina-EP** (cadherina-C) es crítica para mantener la adhesión entre las blastómeras de la blástula de *Xenopus* y es requerida para los movimientos normales de la gastrulación (fig. 3-29; Heasman y col. 1994; Lee y Gumbiner 1995).
- Las protocadherinas son moléculas de adhesión calcio-dependiente que difieren de las cadherinas clásicas en que carecen de conexiones al citoesqueleto a través de las cateninas. Las protocadherinas son muy importantes en la separación de la notocorda de otros tejidos mesodérmicos durante la gastrulación de *Xenopus* (véase cap. 10).

Las cadherinas ensamblan células juntas por unir el mismo tipo de cadherina sobre otra célula. Por este motivo, las células con cadherina-E se adhieren mejor a otras células con cadherina-E, y se separarán de las células que contienen cadherina-N en sus membranas. Este patrón de adhesión, que es denominado **unión homofílica**, puede tener consecuencias importantes en el embrión. En la gástrula de rana *Xenopus*, por ejemplo, el tubo neural expresa cadherina-N, mientras que la epidermis expresa cadherina-E. Normalmente, estos dos tejidos se separan uno del otro de modo tal que el tubo neural queda dentro del cuerpo y la epidermis cubre el cuerpo. Si la epidermis es manipulada experimentalmente para quitar su

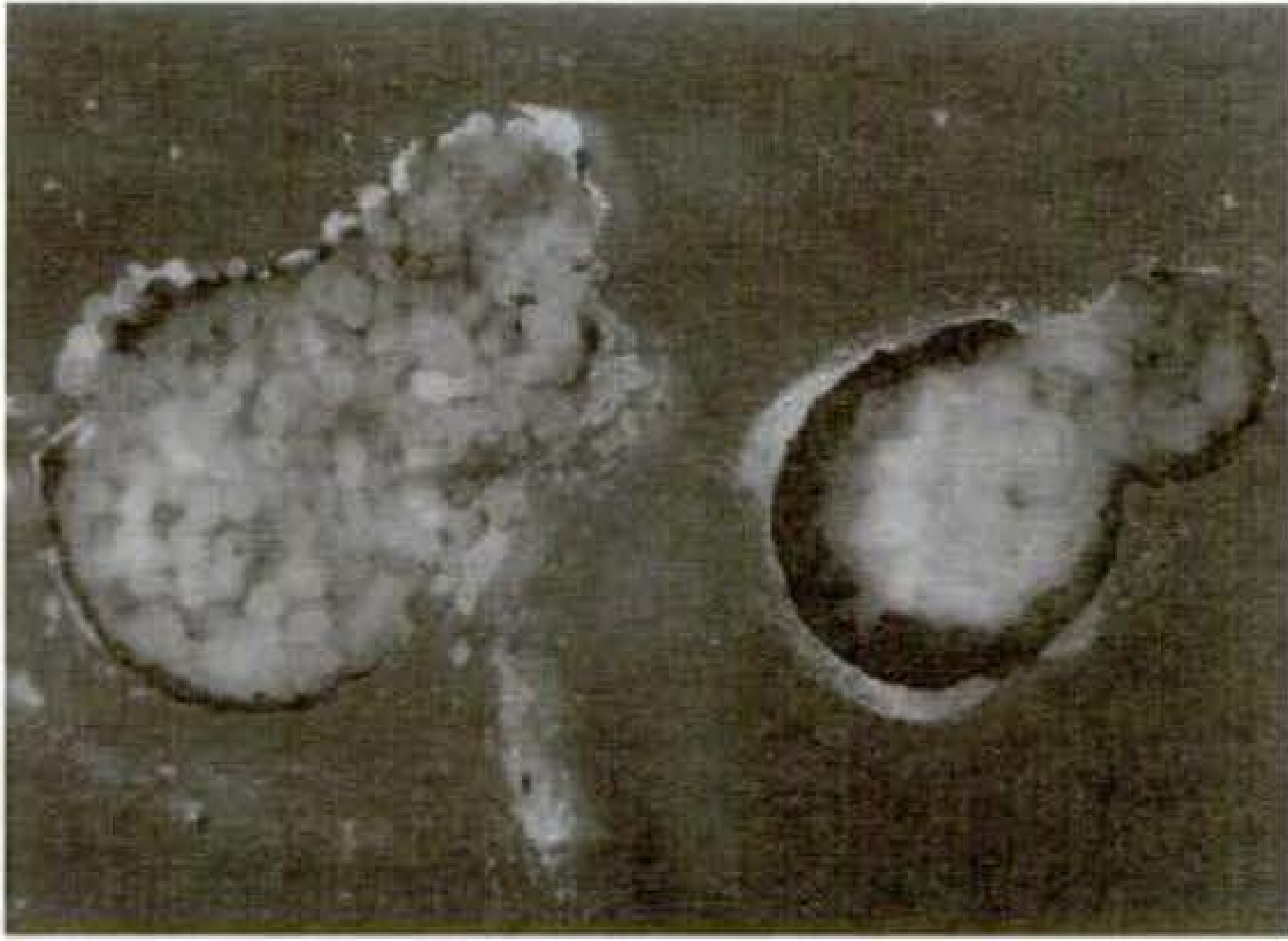


Fig. 3-29. La importancia de las cadherinas para mantener la cohesión entre las células en desarrollo puede ser demostrada mediante la interferencia de su producción. Cuando un ovocito es inyectado con un oligonucleótido antisentido contra un mRNA de cadherina heredado de la madre (de este modo se previene la síntesis de cadherina), las células internas del embrión resultante se dispersan cuando el casquete animal es quitado (izquierda). En embriones control (derecha), las células internas se mantienen juntas. (Según Heasman y col. 1994; fotografía cortesía de J. Heasman.)

cadherina-E, el epitelio epidérmico no se puede mantener unido. Si se hace expresar a la epidermis cadherina-N, o si se hace que células neurales pierdan estas cadherinas, el tubo neural no se separará de la epidermis (fig. 3-30; Detrick y col. 1990; Fujimori y col 1990). Por esta razón, los límites pueden ser creados entre las poblaciones que expresan cadherinas diferentes.

La cantidad de cadherina puede también mediar la formación de estructuras embrionarias. Esto primero fue visto que era una posibilidad cuando Steinberg y Takeichi (1994) colaboraron en experimentos utilizando dos líneas celulares que eran idénticas excepto por el hecho que sintetizaban diferentes cantidades de cadherina-P. Cuando estos dos grupos de células, cada una expresando una cantidad diferente de cadherinas, fueron mezclados, las células que expresaban más cadherina tenían una cohesión superficial más elevada y migraban internamente al grupo de células de menor expresión. Este proceso parece funcionar en el embrión de este modo (Godt y Tepass 1998; González-Reyes y St. Johnston 1998).

La sincronización de los eventos específicos de desarrollo puede depender de la expresión de cadherina. Por ejemplo, la cadherina-N aparece en el mesénquima de la pata del pollo en desarrollo justo antes de que las células mesenquimáticas se condensen y formen nódulos de cartílago (que son los precursores del tejido óseo). Esta cadherina no se observa previamente a la condensación, ni es vista posteriormente. Si los miembros son inyectados justo previo a la condensación mesenquimática con anticuerpos que bloquean a la cadherina-N, las células mesenquimáticas no pueden condensarse y no logran formar cartílago (Oberlander y Tuan 1994). Por esta razón, parece ser que la señal para comenzar la formación de cartílago en la extremidad del pollo es la aparición de la cadherina-N.

SITIO WEB 3.7 **Cadherinas: anatomía funcional (Cadherins: Functional anatomy).** La molécula de cadherina tiene varios dominios funcionales que median sus actividades, y en la actualidad los mecanismos de adhesión homofílicos están comenzando a resolverse.

SITIO WEB 3.8 **Otras moléculas de adhesión celular (Other cell adhesion molecules).** Hay más tipos de moléculas de adhesión que las cadherinas. Este sitio web revisa algunas de las otras moléculas de adhesión celular y de adhesión de sustratos que han sido descubiertas.

Durante el desarrollo, las cadherinas funcionan con frecuencia con otros sistemas de adhesión. Por ejemplo, uno de los momentos más críticos en la vida de los mamíferos es cuando el embrión está pasando a través del útero. Si el desarrollo debe seguir, el embrión tiene que adherirse al útero e incorporarse a la pared uterina. Esta es la razón por la cual la primera diferenciación, incluso en el desarrollo de mamíferos, distingue a las células del **trofoblasto** (las células externas que lo unen al útero) de la **masa celular interna** (aquellas células que generarán al organismo adulto). Este proceso se produce cuando el embrión viaja desde la región superior del oviducto en su camino hacia el útero. Las células del trofoblasto están dotadas con varias moléculas de adhesión para anclar el embrión a la pared uterina. En primer lugar, contienen cadherinas-E y cadherinas-P (Kadokawa y col. 1989), y estas cadherinas reconocen cadherinas semejantes sobre las células uterinas. En segundo lugar, tienen receptores (proteínas intregrinas) para el colágeno y para las glucoproteínas heparán sulfato de la pared uterina (Farach y col. 1987;

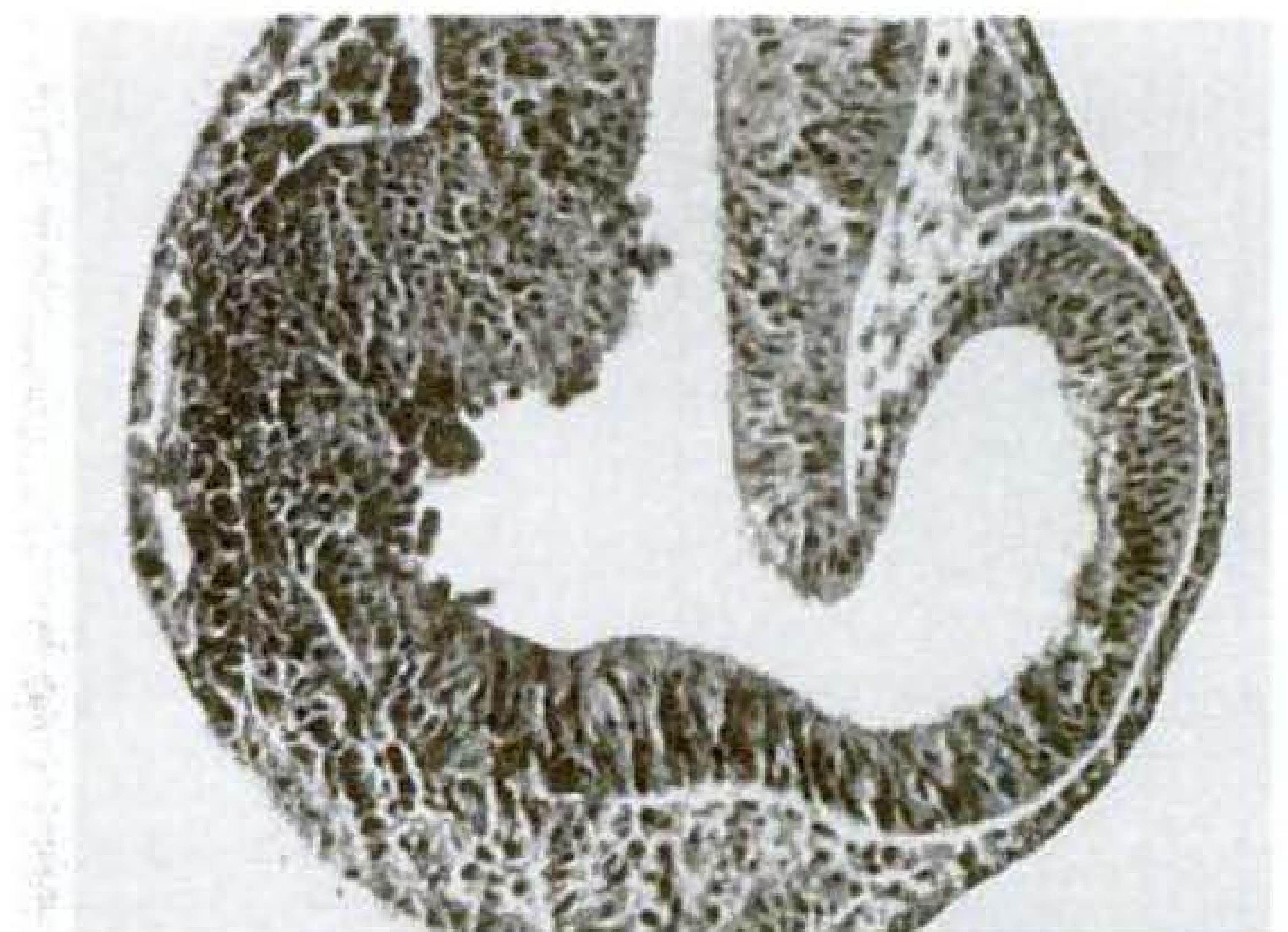


Fig. 3-30. Importancia de la cadherina-N en la separación del ectodermo neural y epidérmico. En el estado de 4 células, las blastómeras que formaron el lado izquierdo del embrión de *Xenopus* fueron inyectadas con mRNA para cadherina-N que carece de región extracelular de la cadherina. Esta mutación bloquea la función de la cadherina-N. Durante la neurulación, las células con la proteína mutante no forman una capa coherente distinta de la epidermis. (De Kintner 1993; fotografía cortesía de C. Kintner.)

Carson y col. 1988, 1993; Cross y col. 1994). En tercer lugar, las células del trofoblasto también tienen una enzima glucosiltransferasa modificada que se extiende hacia afuera desde la membrana celular y que puede unir a residuos específicos de hidratos de carbono sobre las glucoproteínas uterinas (Dutt y col. 1987). Para algo tan importante como la implantación del embrión de mamífero, no es sorprendente que varios sistemas de moléculas de adhesión celular aparezcan trabajando juntos.

Las preguntas de morfogénesis continúan siendo algunas de las más fascinantes de toda la biología del desarrollo. Piense, por ejemplo, en las miles de conexiones específicas hechas por millones de células dentro del cerebro humano, o considere los mecanismos por el que las cámaras cardíacas se forman sobre los lados correctos y llegan a ser conectadas con las arterias y venas apropiadas. Éstas y otras preguntas serán específicamente tratadas en capítulos posteriores.

Principios de desarrollo: embriología experimental

1. Las normas de la reacción describen la capacidad heredada de un embrión de desarrollar una gama de fenotipos. El ambiente puede tener un papel en seleccionar el fenotipo que es expresado. (Los ejemplos incluyen la determinación del sexo temperatura-dependiente y los cambios fenotípicos estacionales en las orugas y mariposas.)
2. Los organismos en desarrollo están adaptados al nicho ecológico en el que se desarrollan. (Los ejemplos incluyen la capacidad de los huevos de rana expuestos a la luz del sol para reparar su DNA dañado.)
3. Antes que las células se diferencien abiertamente en muchos tipos celulares del cuerpo, experimentan un compromiso "encubierto" para algunos destinos. Este compromiso es primero lábil (la etapa de especificación) pero posteriormente llega a ser irreversible (la etapa de determinación).
4. En algunos embriones, la eliminación de la blastómera de un embrión provoca en éste la ausencia de los tejidos formados por esa blastómera. Esta especificación autónoma produce un patrón de desarrollo en mosaico. (Los ejemplos incluyen al caracol temprano y a los embriones de tunicado.)
5. En la especificación autónoma, los determinantes morfogenéticos en el citoplasma de la célula huevo son repartidos durante la segmentación entre las diferentes blastómeras. (Un ejemplo es el citoplasma de media luna amarilla que se encuentra en las células formadoras de músculo de los embriones de tunicado.)
6. En algunos embriones, la eliminación de una blastómera puede ser compensada porque las otras células cambian sus destinos. Cada célula tiene el potencial para dar origen a más tipos celulares que los que normalmente ésta produce. Esta especificación condicional produce un patrón de desarrollo regulativo donde los destinos celulares son determinados relativamente tarde. (Los ejemplos incluyen a embriones de rana y de mamífero.)
7. En la especificación condicional, el destino de una célula a menudo depende de las interacciones con sus vecinas.
8. En la especificación condicional, los grupos de células pueden tener sus destinos determinados por un gradiente de concentración de un morfógeno. Las células especificadas por este morfógeno pueden constituir un campo morfogenético.
9. Las células madre pueden generar otra célula madre así como un tipo celular más comprometido. Al generar más células madre, la población continúa.
10. En la especificación sincitial, los destinos de las células están determinados por los gradientes de un morfógeno dentro del citoplasma de la célula huevo.
11. Los diferentes tipos celulares pueden autosepararse en regiones por medio de moléculas de superficie celular tales como las cadherinas. Estas moléculas pueden ser críticas en el modelado (establecimiento de un patrón) de células en tejidos y órganos.
12. Los controles negativos les dicen al investigador que un determinado agente no causa el fenómeno observado. Tales controles son críticos para sostener que algunos otros agentes causan el fenómeno.
13. Los controles positivos confirman que los protocolos de un investigador están funcionando, de modo tal que si se observa un resultado negativo, no es meramente debido a un procedimiento defectuoso.

Bibliografía citada

Adams, N. L. and J. M. Shick. 1996. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis. Photochem. Photobiol. 64: 149-158.

Adams, N. L. and 1- M. Shick. 2001. Mycosporine-like amino acids prevent WB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis. Mar. Biol. 138: 267-280.

Allman, J. A. 1864. Reproductive systems in the Hydroidaea. Published in Report of the Thirty-third Meeting of the British Association, 1869.

Ariizumi, T. and M. Asashima. 1994. In vitro control of the embryonic form of Xenopus laevis by activin A: Time- and dose-dependent inducing properties of activin-treated ectoderm. Dev. Growth Diff. 36: 499-507.

Armstrong, P. B.1989. Cell sorting out: The self-assembly of tissues in vitro.

CRC Git. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24: 119-149.

Baltzer, F. 1914. Die Bestimmung und der Dimorphismus des Geschlechtes bei Bonellia. Sber. Phys.-Med. Ges. Würzb. 43: 1-4.

Blaustein, A. R., P. D. Hoffman, D. G. Hokit, J. M. Kiesecker, S. C. Walls and J. B. Hays. 1994. UV repair and resistance to solar W-B in amphibian eggs: A link to population declines? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1791-1795.

Boucaut, J. C. 1974. Étude autoradiographique de la distribution de cellules embryonnaires isolées, transplantées dans le blastocele chez Pleurodeles waltii Michah (Amphibien, Urodele). Ann. Embryol. Morphol. 7: 7-50.

Carson, D. D., J.-P. Tang and S. Gay. 1988. Collagens support embryo attachment and out-growth in vitro: Effects of the Arg-Gly-Asp sequence. Dev. Biol. 127: 368-375.

Carson, D. D., J.-P. Tang and J. Julian. 1993. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. Dev. Biol. 155:97-106.

Chabry, L. M. 1887. Contribution a l'embryologie normale tératologique des ascidies simples. J. Anat. Physiol. Norm. Pathol. 23: 167-321.

Cross, J. C., Z. Werb and S. J. Fisher. 1994. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. Science 266: 1508-1518.

Davidson, E. H. 1991. Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. Development 113: 1-26.

Davis, G. S., H. M. Phillips and M. S. Steinberg. 1997. Germ-layer surface tension and "tissue affinities" in Rana pipiens: Quantitative measurement. Dev. Biol. 192: 630-644.

De Robertis, E. A., E. M. Morita and K. W. Y. Cho. 1991. Gradient fields and homeobox genes. Development 112: 669-678.

Detrick, R. J., D. Dickey and C. R. Kintner. 1990. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in Xenopus embryos. Neuron 4: 493-506.

Driesch, H. 1892. The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development: Experimental production of partial and double formations. In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, 1974.

Driesch, H. 1893. Zur Verlagerung der Blastomeren des Echinideneies. Anat. Anz. 8: 348-357.

Driesch, H. 1894. Analytische Theorie de organischen Entwicklung. W. Engdmann, Leipzig.

Dutt, A., J.-P. Tang and D. D. Carson. 1987. Lactosaminoglycans are involved in uterine epithelial cell adhesion in vitro. Dev. Biol. 119: 27-37.

Dyson, S. and J. B. Gurdon. 1998. The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. Cell. 93: 557-568.

Farach, M. C., J. P. Tang, G. L. Decker and D. D. Carson. 1987. Heparin/heparan sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos in vitro. Dev. Biol. 123: 401-410.

Ferguson, M. W. J. and T. Joanen. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. Nature 296: 850-853.

Fischer, J.-L. 1991. Laurent Chabry and the beginnings of experimental embryology in France. In S. Gilbert (ed.), A Conceptual History of Modern Embryology. Plenum, New York, pp. 31-41.

Foty, R. A., C. M. Pfleger, G. Forgacs and M. S. Steinberg. 1996. Surface tensions of embryonic cells predict their mutual envelopment behavior. Development 122: 1611-1620.

Fujimori, T., S. Miyatani and M. Takeichi. 1990. Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in Xenopus embryos. Development 110: 97-104.

Fukui, A. and M. Asashima. 1994. Control of cell differentiation and morphogenesis in amphibian development. Int. J. Dev. Biol. 38: 257-266.

Gilbert, S. F. and S. Sarkar. 2000. Embryo complexity: Organicism for the 21st century. Dev. Dynam. 219: 1-9.

Giudice, G. and R. Just. 1962. Restitution of whole larvae from disaggregated cells of sea urchin embryos. Dev. Biol. 5: 402-411.

Godt, D. and U. Tepass. 1998. Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. Nature 395: 387-391.

González-Reyes, A. and D. St. Johnston. 1998. The Drosophila AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. Development 125: 3635-3644.

Gosse, R. J. 1969. Principles of Regeneration. Academic Press, New York.

Green, J. B. A. and J. C. Smith. 1990. Graded changes in dose of a Xenopus activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. Naiure 347: 391-394.

Greene, E. 1989. A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar. Science 243: 643-646.

Gurdon, J. B., P. Harger, A. Mitchell and P. Lemaire. 1994. Activin signalling and responses to a morphogen gradient. Nature 371: 487-493.

Gurdon, J. B., A.Mitchell and D. Mahony. 1995. Direct and continuous assessment by cells of their position in a morphogen gradient. Nature 376: 520-521.

Gurdon, J. B., S. Dyson and D. St. Johnston. 1998. Cells' perception of position in a concentration gradient. Cell 95: 159-163.

Hamburger, V. 1988. The Heritage of Experimental Embryology: Hans Spemann and the Organizer. Oxford University Press, New York, p. vii.

Haraway, D. J. 1976. Crystals, Fabrics and Fields: Metaphors of Organicism in Twentieth-Century Biology. Yale University Press, New Haven.

Harrington, A. 1996. Reenchanted Science: Holism in German Culture from Wilhelm II to Hitler. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Harrison, R. G. 1933. Some difficulties of the determination problem. Am. Nat. 67: 306-321.

Hatta, K. and M. Takeichi. 1986. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. Nature 320: 447-449.

Heasman, J., D. Ginsberg, K. Goldstone, T. Pratt, C. Yoshidanaro and C. Wylie. 1994. A functional test for maternally inherited cadherin in Xenopus shows its importance in cell adhesion at the blastula stage. Development 120: 49-57.

Hertwig, O. 1894. Zeit- und Streitfragen der Biologie 1. Präformation oder Epigenese? Grundzüge einer Entwicklungstheorie der Organismen. Gustav Fischer, Jena.

Hörstadius, S. 1939. The mechanics of sea urchin development studied by operative methods. Biol. Rev. 14: 132-179.

Hörstadius, S. and A. Wolsky. 1936. Studien über die Determination der

Bilateralsymmetrie des jungen Seeigelkeimes. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 135: 69-113.

Huxley, J. and G. R. de Beer. 1934. The Elements of Experimental Embryology. Cambridge University Press, Cambridge.

Jokiel, P. L. and R. H. York, Jr. 1982. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral Pocillopora damicornis and symbiotic zooxanthellae. Bull. Mar. Sci. 32: 301-315.

Just, E. E. 1939. The Biology of the Cell Surface. Blackiston, Philadelphia.

Kadokawa, Y., I. Fuketa, A. Nose, M. Takeichi and N. Nakatsuji. 1989. Expression of E- and P-cadherin in mouse embryos and uteri during the periimplantation period. Dev. Growth Diff. 31: 23-30.

Kiesecker, J. M., A. R. Blaustein and L. K. Belden. 2001. Complex causes of amphibian population declines. Nature 410: 681-684.

Kintner, C. 1993. Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasm domain. Cell 69: 225-236.

Koch, P. B. and D. Buchmann. 1987. Hormonal control of seasonal morphs by the timing of ecdysteroid release in Araschnia levana (Nymphalidae: Lepidoptera). J. Insect Physiol. 36: 159-164.

Lawrence, P. A. 1966. Gradients in the insect segment: The orientation of hairs in the milk-weed bug Oncopeltus fasciatus. J. Exp. Zool. 44: 602-620.

Lee, C.-H. and B. M. Gumbiner. 1995. Disruption of gastrulation movements in Xenopus by a dominant-negative mutant for C-cadherin. Dev. Biol. 171: 363-373.

Leutert, T. R.1974. Zur Geschlechtsbestimmung und Gametogenese von Bonellia viridis Rolando. J. Embryol. Exp. Morphol. 32: 169-193.

Marcus, N. H. 1979. Developmental aberrations associated with twinning in laboratory-reared sea urchins. Dev. Biol. 70: 274-277.

McClendon, J. F. 1910. The development of isolated blastomeres of the frog's egg. Am. J. Anat. 10: 425-430.

McDowell, N., A. M. Zorn, D. J. Crease and J. B. Gurdon. 1997. Activin has direct long-range signalling activity and can form a concentration gradient by diffusion. Curr. Biol. 7: 671-681.

Mead, K. S. and D. Epel. 1995. Beakers versus breakers: How fertilization in the laboratory differs from fertilization in nature. Zygote 3: 95-99.

Monroy, A. and A. A. Moscona. 1979. Introductory Concepts in Developmental Biology. University of Chicago Press, Chicago.

Morgan, T. H. 1905 An attempt to analyze the henomenon of polarity in Tubularia. J. Exp. Zool. 1: 589-591.

Morgan, T. H. 1906. "Polarity" considered as a phenomenon of gradation of materials. J. Exp Zool. 2: 495-506.

Moscona, A. A. 1952. Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. Exp. Cell Res. 3: 535-539.

Moscona, A. A. 1961. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interaction in vitro. Exp. Cell Res. 22: 455-475.

Moscona, A. A. 1974. Surface specification of embryonic cells: Lectin receptors, cell recognition, and specific cell ligands. In A. Monroy (ed.), The Cell Surface in Development. Wiley, New York, pp. 67-99.

National Institutes of Health. 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. http://www.nih.gov /news/stemcell/fullrptstem.pdf.

Needham, J. 1943. Time: The Refreshing River. Allen and Unwin, London.

Nijhout, H. F. 1991. The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns. Smith-sonian Institution Press, Washington, D.C.

Nose, A. and M. Takeichi. 1986. A novel cadherin adhesion molecule: Its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. J. Cell Biol. 103: 2649-2658.

Nüsslein-Volhard, C., H. G. Fröhnhofer and R. Lehmann. 1987. Determination of anterioposterior polarity in Drosophila. Science 238: 1675-1681.

Nyhart, L. K. 1995. Biology Takes Form: Animal Morphology and the German Universities, 1800-1900. University of Chicago Press, Chicago.

Oberlender, S. A. and R. S. Tuan. 1994. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. Development 120: 177-187.

Opitz, J. M. 1985. The developmental field concept. Am. J. Med. Genet. 21: 1-11.

Phillips, K. 1994. Tracking the Vanishing Frogs: An Ecological Mystery. St. Martin's Press, New York.

Reverberi, G. and A. Minganti. 1946. Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine spermentale sull'ouvo di Ascidiella aspersa e di Ascidia malaca allo stadio di 8 blastomeri. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 20: 199-253. (Quoted in G. Reverberi, Experimental Embryology of Marine and Fresh-water Invertebrates. North-Holland, Amsterdam, 1971, p. 537.)

Roux, W. 1888. Contributions to the developmental mechanics of the embryo. On the artificial production of half-embryos by destruction of one of the first two blastomeres and the later development (postgeneration) of the missing half of the body. In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.) 1974, Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 2-37.

Roux, W. 1894. Einleitung zum Archiv fur Entwicklungsmechanik. Arch. Embryol. 1: 1-142. English translation reprinted in . M. Maienschein (ed.), 1986, Defining Biology. Harvard University Press, Cambridge, MA, pp. 107-148.

Schlichting, C. D. and M. Pigliucci. 1998. Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Schmalhausen, I. I. 1949. Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. University of Chicago Press, Chicago.

Shimizu, K. and J. B. Gurdon. 1999. A quantitative analysis of signal transduction from activin receptor to nucleus and its relevance to morphogen gradient interpretation. Proc. Natl. Acad Sci. USA 96: 6791-6796.

Siebeck, O. 1988. Experimental investigation of UV tolerance in hermatypic corals. Mar. Ecol. Prog. Ser. 43: 95-103.

Slack, I. M. W. 1991. From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development. Cambridge University Press, New York.

Spemann, H. 1921. Die Erzeugung tierischer Chimaeren durch heteroplastiche embryonale Transplantation zwischen Triton cristatus u. taeniatus. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 48: 533-570.

Stearns, S. C., G. de long and R. A. Newman. 1991. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. Trends Ecol. Evol. 6: 122-126.

Steinberg, M. S. 1964. The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. In M. Locke (ed.), Cellular Membranes in Development. Academic Press, New York, pp. 321-434.

Steinberg, M. S. 1970. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. J. Exp. Zool. 173: 395-434.

Steinberg, M. S. and M. Takeichi. 1994. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 206-209.

Stumpf, H. 1966. Mechanism by which cells estimate their location within the body. Nature 212: 430-431.

Takeichi, M. 1987. Cadherins: A molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis. Trends Genet. 3: 213-217.

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 251: 1451-1455.

Takeichi, M., H. S. Ozaka, K. Tokunaga and T. S. Okada. 1979. Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. Dev. Biol. 70: 195-205.

Toivonen, S. and L. Saxén. 1955. The simultaneous inducing action of liver and bone marrow of the guinea pig in implantation and explantation experiments of Triturus. Exp. Cell Res. [Suppl.] 3: 346-357.

Townes, P. L. and J. Holtfreter. 1955. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool. 128: 53-120.

van der Weele, C. 1995. Images of Development: Environmental Causes in Ontogeny. Elinkwijk, Utrecht.

Weismann, A. 1875. Über den Saison-Dimorphismus der Schmetterlinge. In. Studien zur Descendenz-Theorie. Engelmann, Leipzig.

Weismann, A. 1892. Essays on Heredity and Kindred Biological Problems. Translated by E. B. Poulton, S. Schoenland and A. E. Shipley. Clarendon, Oxford.

Weismann, A. 1893. The Germ-Plasm: A Theory of Heredity. Translated by W. Newton Parker and H. Ronnfeld. Walter Scott Ltd., London.

Weiss, P. 1923. Die Regeneration der Urodele-nextremitat als Selbst differenzierung des Organrestes. Naturwissenschaften 11: 669-677.

Weiss, P. 1939. Principles of Development. Holt, New York.

Whittaker, J. R. 1973. Segregation during ascidian embryogenesis of egg cytoplasmic information for tissue-specific enzyme development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2096-2100.

Whittaker, J. R. 1977. Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. J. Exp. Zool. 202: 139-153.

Whittaker, J. R. 1982. Muscle cell lineage cytoplasm can change the developmental expression in epidermal lineage cells of ascidian embryos. Dev. Biol. 93: 463-470.

Wilkins, A. S. 1993. Genetic Analysis of Animal Development, 2nd Ed. Wiley-Liss, New York.

Wilson, E. B. 1896. The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson, E. B.1904. Experimental studies on germinal location. J. Exp. Zool. 1: 1-72.

Wolpert, L. 1968. The French flag problem: A contribution to the discussion on pattern formation and regulation. In C. H. Waddington (ed.), Towards a Theoretical Biology. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 125-133.

Wolpert, L. 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. J. Theor. Biol. 25: 1-47.

Wolpert, L. 1977. The Development of Pattern and Form in Animals. Carolina Biological, Burlington, NC.

Wolpert, L. 1978. Pattern formation in biological development. Sci. Am. 239(4): 154-164.

Woltereck, R. 1909. Weitere experimentelle Untersuchungen uber Artveränderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunderscheide bei Daphniden. Versuch. Deutsch. Zool. Ges. 1909: 110-173.

Capítulo 4 La base genética del desarrollo

Los secretos que me atraen –que me arrastran– son generalmente secretos de la herencia: cómo la semilla de pera llega a ser un árbol de pera, por ejemplo, en lugar de un oso polar.
CYNTHIA OZICK (1989)

Aquí, hay un campo central. El desarrollo. Cómo la célula huevo se convierte en un organismo. Pero el desarrollo finalmente incluye a toda la biología: y tendrá que adoptar una base molecular.
SYDNEY BRENNER (1979)

"ENTRE LOS CARACTERES QUE PROPORCIONAN LOS DATOS para la teoría, y el postulado de los genes, para los que los caracteres son referidos, se encuentra el campo entero del desarrollo embrionario." Aquí Thomas Hunt Morgan observó en 1926 que el único camino para llegar desde el genotipo hasta el fenotipo es a través de los procesos del desarrollo.

En los comienzos del siglo XX, la embriología y la genética no se consideraban ciencias separadas, se separaron en la década de 1920, cuando Morgan redefinió a la genética como la ciencia que estudia la *transmisión* de los rasgos heredados, como opuesta a la embriología, la ciencia que estudia la *expresión* de aquellos rasgos. Sin embargo, en los últimos años, las técnicas de biología molecular han efectuado un acercamiento entre la embriología y la genética. En realidad, los dos campos han llegado a estar relacionados a tal grado que hace necesario tratar tempranamente en este texto la genética molecular. Los problemas en el desarrollo animal que no habían podido ser resueltos una década atrás están siendo solucionados ahora por un grupo de técnicas que involucran la síntesis de ácidos nucleicos y la hibridación. Este capítulo intenta poner a estas técnicas nuevas dentro del contexto de los diálogos en curso entre la genética y la embriología.

El origen embriológico de la teoría del gen

Núcleo o citoplasma: ¿cuál controla la herencia?

Mendel los denominó *bildungsfähigen Elemente*, "elementos constructores de la forma" (Mendel 1866, p. 42); nosotros los denominamos genes. Esto es en términos de Mendel, sin embargo, los que vemos como entrelazados de cerca eran los conceptos de herencia y desarrollo en el siglo XIX. Empero, las observaciones de Mendel no indican dónde existen en la célula estos elementos heredados o cómo llegan a ser expresados. La teoría del gen que llegó a convertirse en la piedra angular de la genética moderna se originó a partir de una polémica dentro del campo de la embriología fisiológica (véase cap. 3). A fines de la década de 1800, un grupo de científicos comenzó a estudiar los mecanismos a través de los cuales los gametos femeninos fecundados dan origen a organismos adultos.

Dos jóvenes embriólogos americanos, Edmund Beecher Wilson y Thomas Hunt Morgan (fig. 4-1), llegaron a ser parte de este grupo de "embriólogos fisiólogos," y cada uno llegó a ser partidario en la polémica sobre cuáles de los dos compartimentos del gameto femenino fecundado –el núcleo o el citoplasma– controla la herencia. Morgan se alió con los embriólogos que pensaban que el control del desarrollo se encuentra dentro del citoplasma, mientras que Wilson se alió con Theodor Boveri, uno de los biólogos que consideraba que el núcleo contenía las instrucciones para el desarrollo. De hecho, Wilson (1896, p. 262) declaró que los procesos de meiosis, mitosis, fecundación y regeneración unicelular (solo a partir de fragmentos

A



B



Fig. 4-1. A. E. B. Wilson (1856-1939; mostrado aquí alrededor de 1899), un embriólogo cuyo trabajo sobre la embriología temprana y la determinación del sexo adelantó enormemente la hipótesis cromosómica del desarrollo. (Wilson fue también reconocido por estar entre los mejores violonchelistas amateur en los Estados Unidos.) **B.** Thomas Hunt Morgan (1866-1945) quien reveló la teoría del gen de la embriología. Esta foto –tomada en 1915, cuando se reunían los elementos básicos de la teoría del gen– muestra a Morgan utilizando una lente de mano para separar moscas de la fruta. (A cortesía de W. N. Timmins; B, cortesía de G. Allen.)

que contenían el núcleo) "convergen a la conclusión que la cromatina es el elemento más esencial en el desarrollo".* Él no eludió las consecuencias de esta creencia. Años antes del redescubrimiento de Mendel o de la teoría del gen, Wilson (1895) observó: "Ahora, la cromatina se conoce como estrechamente similar, si no idéntica a una sustancia conocida como nucleína... cuyos análisis muestran una composición química razonablemente definitiva de un ácido nucleico (un ácido orgánico complejo rico en fósforo) y albúmina. Por esta razón llegamos a la destacable conclusión que la herencia puede, quizá, ser efectuada mediante la transmisión física de un compuesto químico particular desde los padres a los hijos".

Algunos de los principales respaldos para la hipótesis cromosómica de la herencia vinieron de los estudios embriológicos de Theodor Boveri (fig. 4-2A), un investigador de la Naples Zoological Station. Boveri fecundó a huevos de erizo de mar (gametos femeninos) con grandes concentraciones de espermatozoides y obtuvo huevos (células huevo o cigotos) que habían sido fecundados por dos espermatozoides. En la primera segmentación, estos cigotos formaban cuatro polos mitóticos y se dividían en cuatro células en lugar de dos (véase cap. 7). Boveri luego separó a las blastómeras y demostró que cada célula se desarrollaba de manera anormal, y en un sentido diferente, como resultado de que cada una de las células tenía diferentes tipos de cromosomas. Así, Boveri afirmó que cada cromosoma tenía una naturaleza individual y controlaba diferentes procesos vitales.

Añadiéndose a la evidencia de Boveri, E. B. Wilson (1905) y Nettie Stevens (1905a,b; fig. 4-2B) demostraron una correlación crítica entre los cromosomas nucleares y un organismo en desarrollo: los embriones XO o XY se convierten en machos; los embriones XX llegan a ser hembras. Aquí estaba una propiedad nuclear que tenía correlación con el desarrollo. Finalmente, Morgan comenzó a obtener mutaciones que estaban correlacionadas con el sexo y con los cromosomas X, y comenzó a ver a los genes como físicamente unidos entre sí sobre

* Nótese que Wilson estaba escribiendo acerca de las unidades constructoras de la forma en cromatina en 1896; antes del redescubrimiento de los trabajos de Mendel o de la fundación de la teoría del gen. Para posteriores análisis de las interacciones entre Morgan y Wilson que llevaron a la teoría del gen, véase Gilbert 1978, 1987; y Allen 1986.

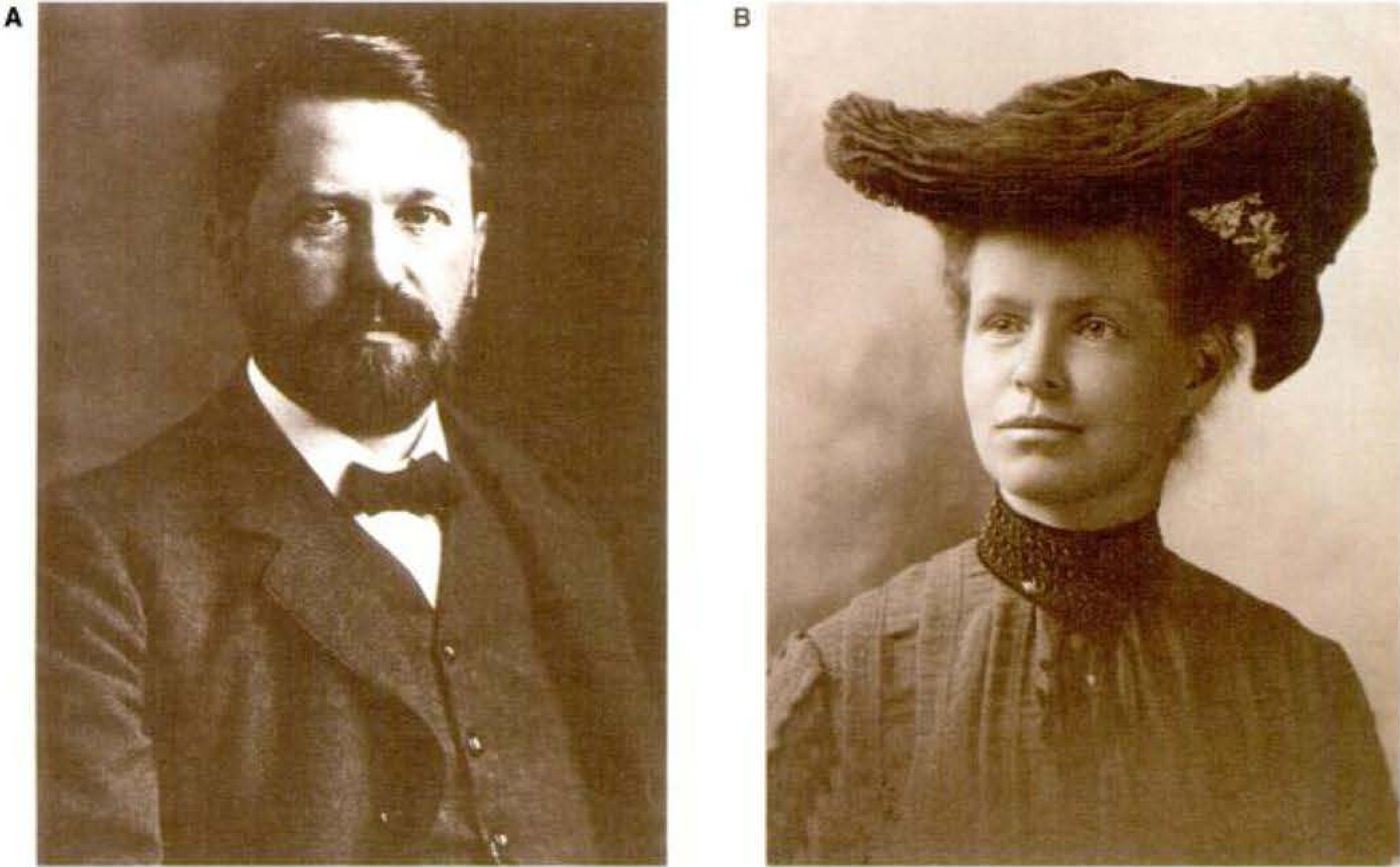


Fig. 4-2. La singularidad cromosómica fue demostrada por Boveri y Stevens. **A.** Theodor Boveri (1862-1915), de cuyo trabajo, Wilson (1896) dijo, "llevó a cabo la fusión real entre citología, embriología y genética -un logro biológico que... no es en segundo lugar a cualquiera de nuestro tiempo." Esta fotografía fue tomada en 1908, cuando los estudios cromosómicos y embriológicos de Boveri estaban en su apogeo. **B.** Nettie M. Stevens (1861-1912), quien se entrenó con Boveri y Morgan, vista aquí en 1904 cuando era una estudiante posdoctoral y llevaba a cabo la investigación que estableció una correlación entre el número de cromosomas X con el desarrollo sexual. (**A** de Baltzer 1967; **B** cortesía del Carnegie Institute of Washington.)

los cromosomas. El embriólogo Morgan había demostrado que los cromosomas nucleares son responsables del desarrollo de los caracteres heredados.*

> SITIO WEB 4-1 **El origen embriológico de la teoría del gen (The embryological origin of the gene theory).** La emergencia de la teoría del gen a partir de la investigación embriológica es una historia fascinante y complementa la historia de la genética que comienza con los experimentos de Mendel.

La separación entre embriología y genética

La evidencia de Morgan proporcionó las bases materiales para el concepto de gen. Originalmente, este tipo de genética fue vista como formando parte de la embriología, pero a principio de la década de 1930, la genética se convierte en su propia disciplina y desarrolla su propio vocabulario, publicaciones, sociedades, organismos que favorecen la investigación, cátedras y reglas de evidencia. También emergió la hostilidad entre la embriología y la genética. Los genetistas creían que los embriólogos eran anticuados y que el desarrollo podía explicarse completamente como el resultado de la expresión de genes. Por el contrario, los embriólogos consideraban a los genetistas como carentes de fundamentos acerca de cómo en realidad se desarrolla un organismo y opinaban que la genética era irrelevante para las preguntas embriológicas. Los embriólogos como Frank Lillie (1927), Ross Granville Harrison (1937), Hans Spemann (1938) y Ernest E. Just (1939) (fig. 4-3) afirmaron que no podría haber teoría genética del desarrollo hasta que por lo menos tres desafíos importantes fueran resueltos por los genetistas:

1. Los genetistas tenían que explicar cómo los cromosomas -que se pensaba eran idénticos en cada una de las células del organismo- producen diferentes y cambiantes tipos de citoplasmas celulares.
2. Los genetistas tenían que proporcionar evidencia de que los genes controlan los estados tempranos de la embriogénesis. Casi todos los genes conocidos en ese tiempo afectaban las etapas de modelado final en el desarrollo (color de ojo, forma de la cerda, la formación de venas en el ala de *Drosophila*). Como Just dijo (citado en Harrison 1937), los embriólogos estaban interesados en cómo una mosca forma su dorso, no en el número de quetas (cerdas) sobre su dorso.

---

* La evidencia de Morgan para el control nuclear del desarrollo fue contra sus expectativas; hasta 1910, fue el principal defensor del control citoplasmático del desarrollo. Wilson fue uno de los amigos más cercanos de Morgan, y Morgan consideraba a Stevens su mejor estudiante graduado de aquella época. Ambos estaban contra Morgan en este tema. Aun cuando ellos estaban en desacuerdo, Morgan apoyó incondicionalmente los requerimientos de Stevens para fondos de investigación, diciendo que sus calificaciones eran las mejores posibles. Wilson escribió una carta de apoyo igualmente laudatoria, aun cuando ella pudiese ser una investigadora rival (véase Brusch 1978).

A

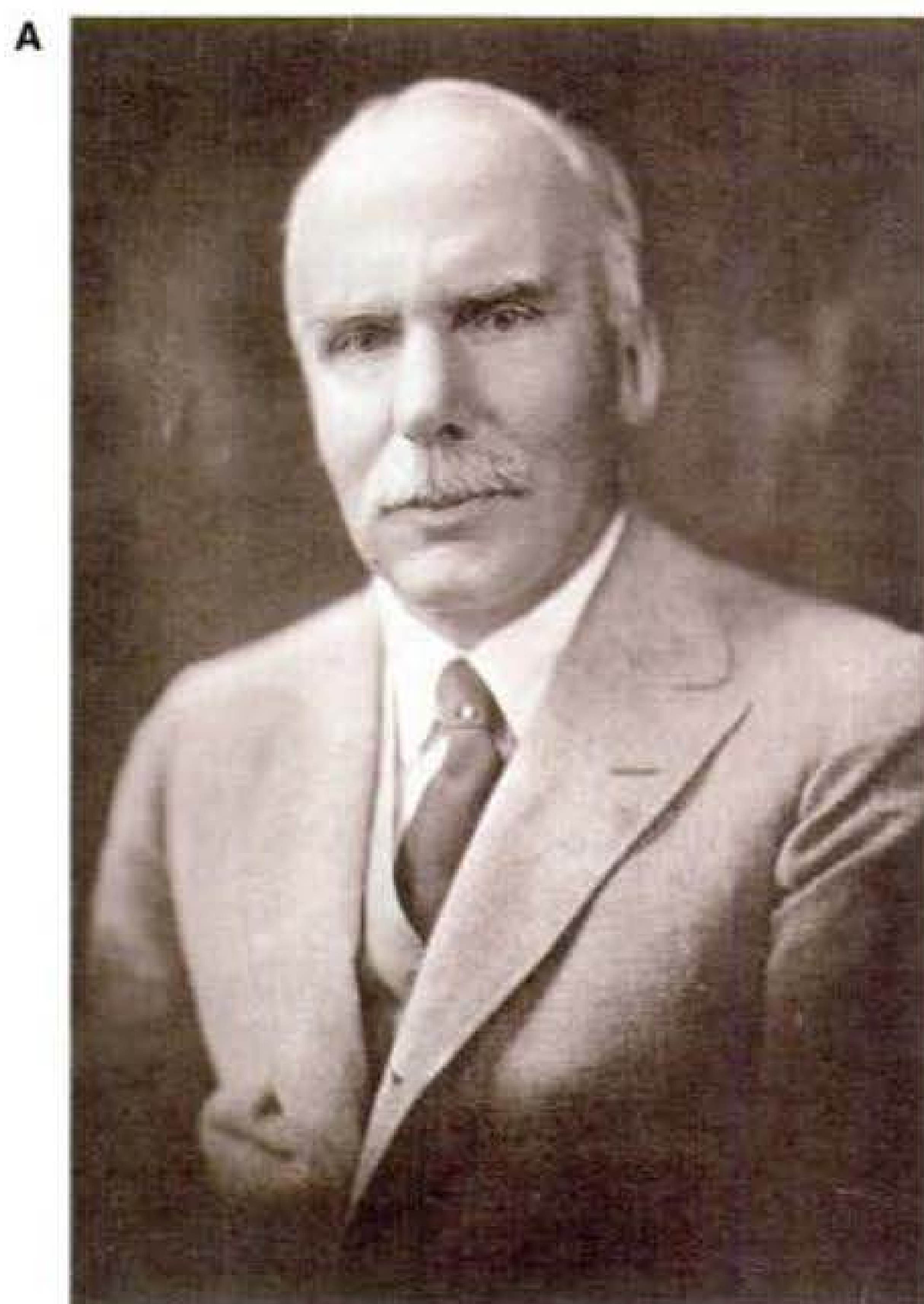
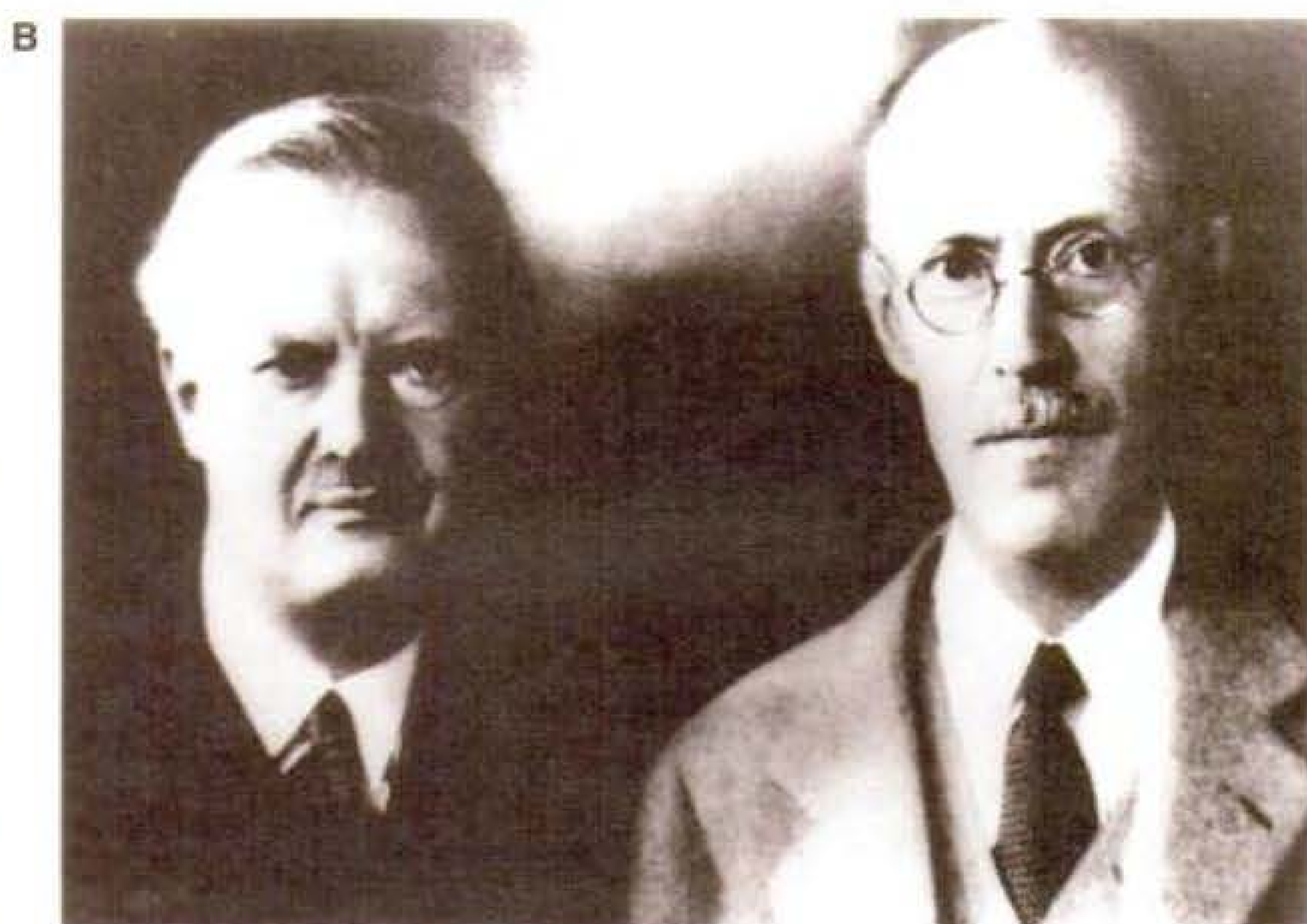


Fig. 4-3. Los embriólogos en la década de 1930 intentaron mantener la genética bajo "el control" de su campo. A. Frank Lillie dirigía el Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole y fue líder en la investigación sobre fecundación y reproducción endocrinológica. B. Hans Spemann (izquierda) y Ross Harrison (derecha) perfeccionaron las operaciones de trasplante utilizadas para descubrir cuándo son determinados los ejes del cuerpo y de las extremidades. Sostenían que los genetistas no tenían mecanismos para explicar cómo los mismos genes nucleares podían crear diferentes tipos celulares durante el desarrollo. C. Ernest E. Just llevó a cabo descubrimientos críticos sobre fecundación. Alentó la genética y resaltó el papel de la membrana celular en la determinación de los destinos de las células. (A cortesía de V. Hamburger; B cortesía de T. Horder; C cortesía del Laboratorio de Biología Marina, Woods Hole.)

B



C



3. Los genetistas tenían que explicar fenómenos tales como la determinación del sexo en ciertos invertebrados (y vertebrados como reptiles), en los que el ambiente determina el fenotipo sexual.

El debate llegó a ser bastante intenso. En una reflexión retórica de las preocupaciones políticas de los fines de la década de 1930, Harrison (1937) advirtió:

> *Ahora que la necesidad de relacionar los datos de la genética para la embriología es generalmente reconocida y que las ansias de los genetistas están comenzando a impulsarlos en nuestra dirección, podría no ser inapropiado señalar un peligro de su amenazadora invasión. El prestigio de disfrutar el éxito por la teoría del gen puede fácilmente llegar a convertirse en un obstáculo para el entendimiento del desarrollo al dirigir nuestra atención únicamente hacia el genoma, mientras que los movimientos celulares, la diferenciación, y de hecho todos los procesos de desarrollo son en realidad efectuados por el citoplasma. Nosotros ya tenemos teorías que refieren a los procesos de desarrollo para la acción de los genes y consideran la función total como no más que la realización de los potenciadores de los genes. Tales teorías son en conjunto demasiado unilaterales.*

Hasta que los genetistas pudieran demostrar la existencia de variantes heredadas durante el desarrollo temprano y tuvieran una teoría bien documentada que explicara cómo el mismo cromosoma puede producir diferentes tipos celulares, los embriólogos en general consideraban no necesitar cimentar su ciencia en la acción de los genes.

Las tentativas tempranas en la genética del desarrollo

Sin embargo, algunos científicos opinaban que ni la embriología ni la genética eran completas sin la otra. Hubo varias tentativas para sintetizar las dos disciplinas, pero la primera integración exitosa de la genética y de la embriología se produjo a fines de la década de 1930





Fig. 4-4. Dos de los fundadores de la genética del desarrollo. **A.** Salome Gluecksohn-Schoenheimer (ahora S. Gluecksohn-Waelsch; n. 1907) recibió su doctorado en el laboratorio de Spemann. Al huir de la Alemania de Hitler trajo su perspicacia embriológica al laboratorio de genética de Leslie Dunn en los Estados Unidos. **B.** Conrad Hal Waddington (1905-1975) no creía en la distinción entre la genética y la embriología y trató de encontrar mutaciones que eran activas durante el desarrollo. (A, cortesía de S. Gluecksohn-Waelsch; B de Waddington 1948.)

a partir de Salome Gluecksohn-Schoenheimer (ahora S. Gluecksohn Waelsch) y Conrad Hal Waddington (fig. 4-4). Ambos fueron capacitados en la embriología europea y tuvieron que aprender genética en los Estados Unidos a partir de los estudiantes de Morgan. Gluecksohn-Schoenheimer y Waddington intentaron encontrar mutaciones que afectaran el desarrollo temprano y trataron de descubrir procesos que afectaban estos genes. Gluecksohn-Schoenheimer (1938, 1940) demostró que las mutaciones en el gen Brachyury del ratón causaban un desarrollo anómalo de la porción posterior del embrión y rastreó los efectos de este gen mutante hasta la notocorda, que normalmente tenía que ayudar a inducir el eje dorsoventral.*

Al mismo tiempo, Waddington (1939) aisló varios genes que provocaban malformaciones en las alas de moscas de la fruta (*Drosophila*). También analizó estas mutaciones en términos de cómo los genes podrían afectar el desarrollo del primordio que da origen a estas estructuras. El ala de *Drosophila*, afirmó correctamente, "aparece favorable para investigaciones sobre la acción de los genes en el desarrollo". Así, una de las principales objeciones de los embriólogos al modelo genético del desarrollo –que los genes parecían estar trabajando solo en el modelado final del embrión y no sobre sus principales bosquejos– fue contrarrestada.

* Las observaciones de Gluecksohn-Schoenheimer tomaron 50 años para ser confirmadas por hibridación de DNA. Sin embargo, cuando el gen *Brachyury* (locus-*T*) fue clonado y su expresión detectada mediante la técnica de hibridación in situ (discutida más adelante en este capítulo), Wilkinson y col. (1990) encontraron que "la expresión del gen *T* tenía una función directa en los eventos tempranos de la formación del mesodermo y en la morfogénesis de la notocorda". Mientras que una historia completa de la genética temprana del desarrollo necesita ser escrita, más información sobre sus turbulentos orígenes puede hallarse en Oppenheimer 1981; Sander 1986; Gilbert 1988, 1991, 1996; Burian y col. 1991; Harwood 1993; Keller 1995 y Morange 1996.

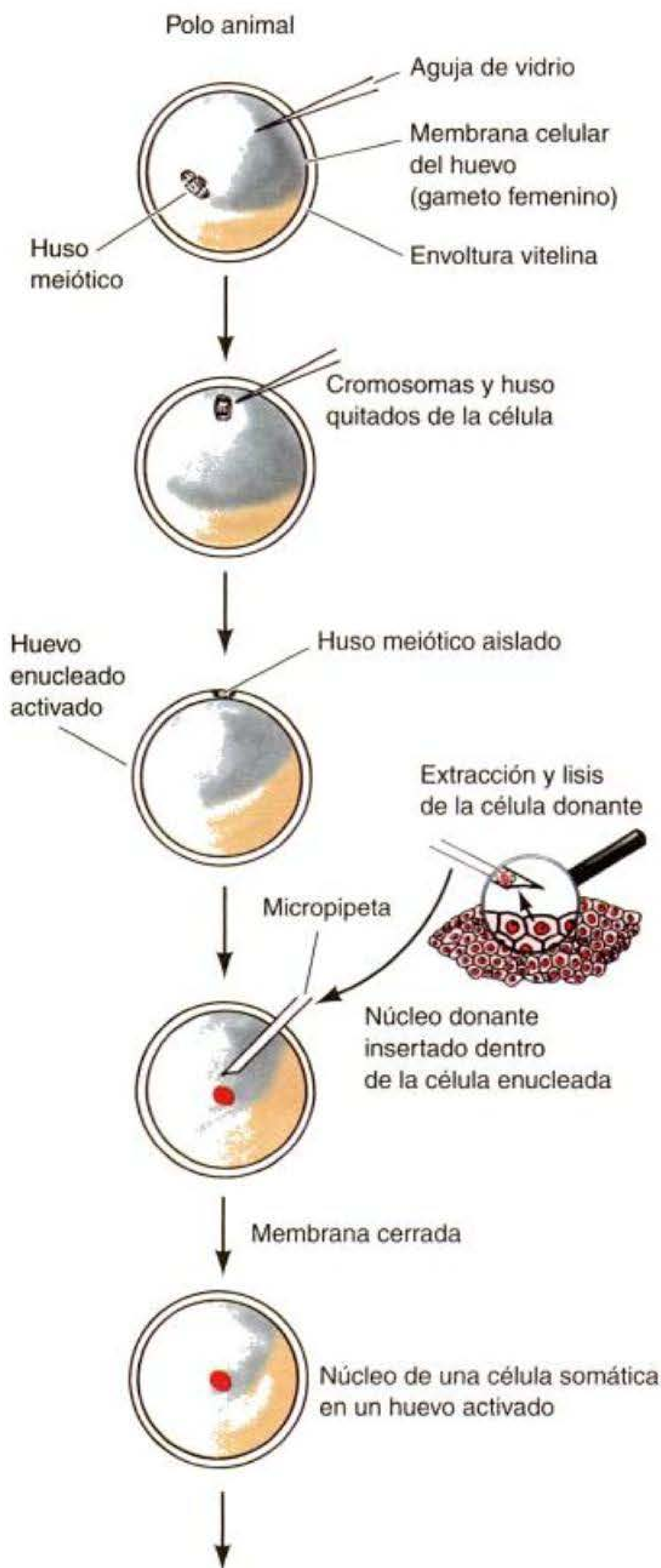
SITIO WEB 4-2 **Creando la genética del desarrollo (Creating developmental genetics).** La reunión de la embriología y de la genética en la genética del desarrollo no se llegó a concretar fácilmente. Estos dos sitios Web examinan algunos de los principales caminos intentados por los investigadores para unir los dos campos.

Evidencia para la equivalencia genómica

La otra objeción principal a una genética basada en la embriología se mantenía: ¿Cómo pueden dirigir el desarrollo los genes nucleares cuando ellos eran los mismos en todos los tipos celulares? La existencia de esta **equivalencia genómica** no era tanto demostrada como asumida (debido a que cada célula es el descendiente mitótico de la célula huevo), de modo tal que uno de los primeros problemas de la genética del desarrollo fue determinar si cada célula de un organismo en efecto tenía el mismo grupo de genes, o **genoma**, como cada una de las otras células.

Clonación del anfibio: la restricción del potencial nuclear

La prueba última para ver si el núcleo de una célula diferenciada ha experimentado una restricción funcional irreversible debe hacer que aquel núcleo genere cualquier otro tipo celular diferenciado en el cuerpo. Si cada núcleo celular es idéntico al núcleo del cigoto, entonces cada núcleo celular debe ser **totipotencial** (capaz de dirigir el desarrollo total de un organismo) cuando es trasplantado en un gameto femenino enucleado activado. Antes de que tal experimento pudiese realizarse, sin embargo, tuvieron que ser perfeccionadas tres técnicas para trasplantar núcleos en los gametos femeninos: 1) un método para enucleación de los huevos (gametos femeninos) huéspedes sin destruirlos; 2) un método para aislar





un núcleo donante intacto y 3) un método para transferir estos núcleos hacia el huevo (gameto femenino) del huésped sin dañar el núcleo o el ovocito.

Las tres técnicas fueron desarrolladas en la década de 1950 por Robert Briggs y Thomas King. En primer lugar, combinaron la enucleación de huevo (gameto femenino) huésped con su activación. Cuando un ovocito (un gameto femenino en vías de desarrollo) a partir de la rana leopardo (*Rana pipiens*) es pinchado con una aguja de vidrio limpia, el gameto femenino experimenta todos los cambios citológicos y bioquímicos asociados con la fecundación. Se produce la reorganización citoplasmática interna de la fecundación, y en el polo animal de la célula tiene lugar la finalización de la meiosis. El huso meiótico puede ser localizado fácilmente debido a que éste empuja lejos a los gránulos de pigmento del polo animal, y perforando al ovocito en este sitio se provoca que el huso y sus cromosomas fluyan fuera del huevo (fig. 4-5). El gameto femenino huésped es ahora considerado activado (la reacción de fecundación necesaria para iniciar el desarrollo se ha completado) y enucleado.

La transferencia del núcleo dentro del gameto femenino se lleva a cabo mediante la perturbación de una célula donante y la transferencia del núcleo liberado hacia el ovocito a través de una micropipeta. Algo de citoplasma acompaña al núcleo a su nuevo hogar, pero el porcentaje de citoplasma donante para el receptor es de solo $1:10^5$, y el citoplasma donante no parece afectar el resultado de los experimentos. En 1952, Briggs y King, utilizando estas técnicas, demostraron que los núcleos celulares de la blástula pueden dirigir el desarrollo de renacuajos completos cuando son transferidos hacia el citoplasma de un huevo (gameto femenino) de rana enucleado activado. Este procedimiento es denominado **transferencia nuclear somática**, o más comúnmente, **clonación**.

¿Qué sucede cuando núcleos a partir de un estado de desarrollo más avanzado son transferidos a ovocitos enucleados activados? King y Briggs (1956) hallaron que mientras que la mayoría de los núcleos de la blástula podrían producir renacuajos enteros, a partir de los estados tardíos se producía un espectacular descenso en la capacidad de los núcleos para dirigir el desarrollo hasta el estado de renacuajo (fig. 4-6). Cuando se utilizaron como donantes los núcleos a partir de células somáticas de renacuajos del estadio de esbozo caudal, no se produjo un desarrollo normal. Sin embargo, los núcleos a partir de las células germinales de los renacuajos del estadio de esbozo caudal (que pueden dar origen a un organismo completo después de la fecundación) fueron capaces de dirigir un desarrollo normal en el 40% de las blástulas que se desarrollaron (Smith 1956). Así, la mayoría de las células somáticas parecen perder su capacidad para dirigir el desarrollo cuando ellas llegan a ser determinadas y diferenciadas.

Fig. 4-5. Procedimiento para el trasplante de núcleos de blástula en huevos (gametos femeninos) enucleados activados de *Rana pipiens*. El tamaño relativo del huso meiótico ha sido exagerado para mostrar la técnica. "Freddy," el apuesto y maduro *R. pipiens* de la fotografía, tuvo su origen mediante este camino por M. DiBerardino y N. Hoffner Orr. La envoltura vitelina es la matriz extracelular que rodea al huevo. (Según King 1966; fotografía cortesía de M. DiBerardino.)

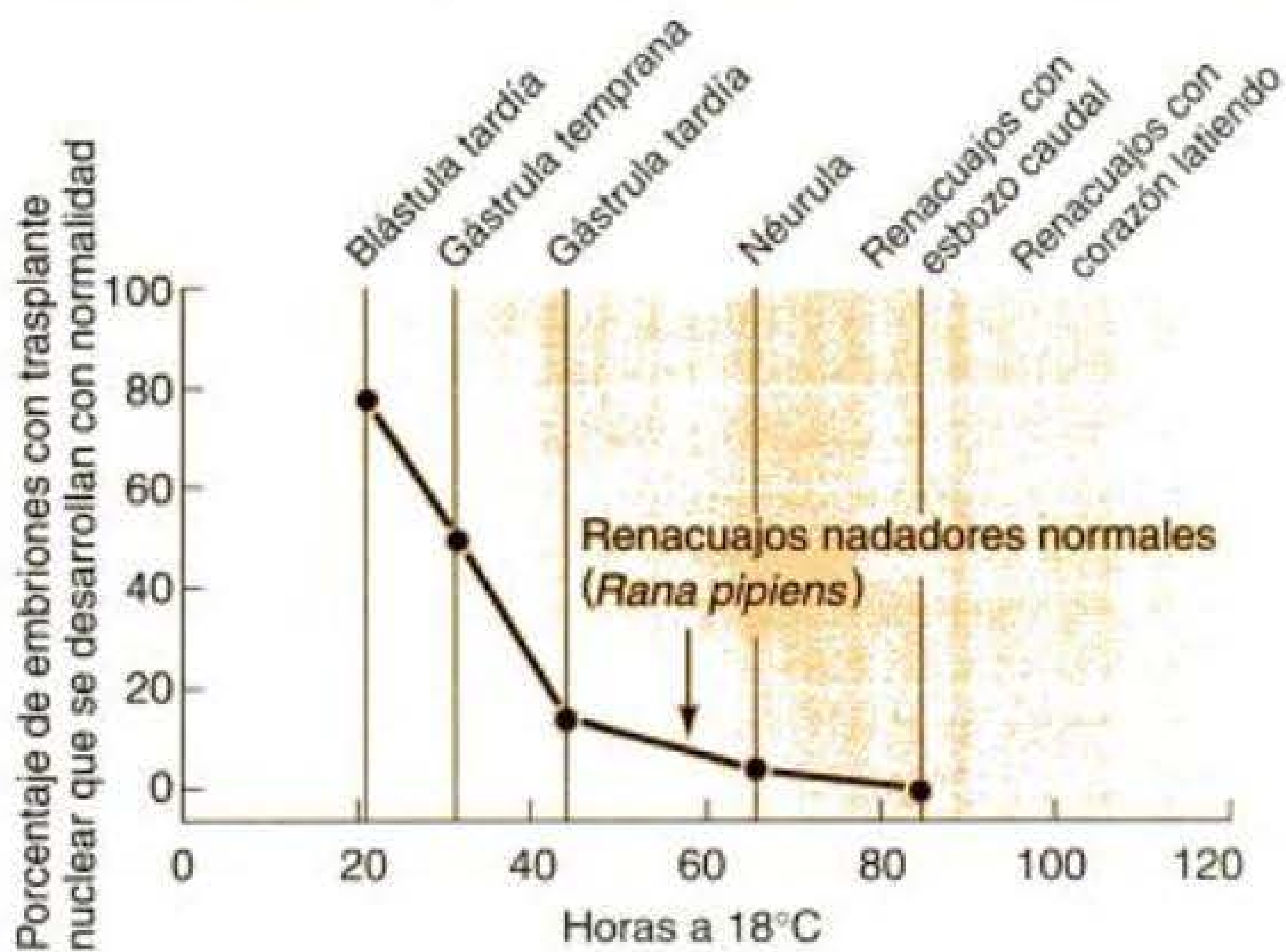


Fig. 4-6. Porcentaje de trasplantes nucleares exitosos como una función de la edad de desarrollo del núcleo donante. La abscisa representa el estadio de desarrollo en el que el núcleo donante (de *R. pipiens*) fue aislado e insertado en un ovocito enucleado activado. La ordenada muestra el porcentaje de aquellos trasplantes capaces de producir blástulas que pueden luego dirigir el desarrollo hacia el estadio de renacuajo nadador. (Según McKinnell 1978.)

Clonación de anfibios: la totipotencialidad de las células somáticas

¿Es posible que algunos núcleos de células diferenciadas difieran de otros en su capacidad para dirigir el desarrollo? John Gurdon y col., utilizando métodos levemente diferentes de trasplante nuclear sobre el huevo (gameto femenino) de *Xenopus*, obtuvieron resultados sugiriendo que los núcleos de algunas células diferenciadas pueden seguir siendo totipotentes. Gurdon, también, encontró una pérdida progresiva del potencial con el incremento de la edad de desarrollo, aunque las células de *Xenopus* conservan sus potenciales por un período más largo que el de las células de la *Rana* (fig. 4-7).

Para clonar anfibios a partir de núcleos de células que se sabe están diferenciadas, Gurdon y col. cultivaron células epiteliales de membranas interdigitales del pie de rana adulta. Estas células demostraron estar diferenciadas: cada una de ellas contenía una queratina específica, la proteína característica de las células de la piel del adulto. Cuando los núcleos a partir de estas células fueron trasplantados a ovocitos enucleados activados de *Xenopus*, ninguno de la primera generación transferida progresó más allá de la formación de un tubo neural poco después de la gastrulación. Mediante trasplantes consecutivos, sin embargo, se generaron numerosos renacuajos (Gurdon y col. 1975). Aunque todos estos renacuajos murieron previamente a alimentarse, demostraron que un único núcleo celular diferenciado todavía retiene increíbles potenciales. Un núcleo de una célula de la piel pudo producir todas las células de un renacuajo joven.

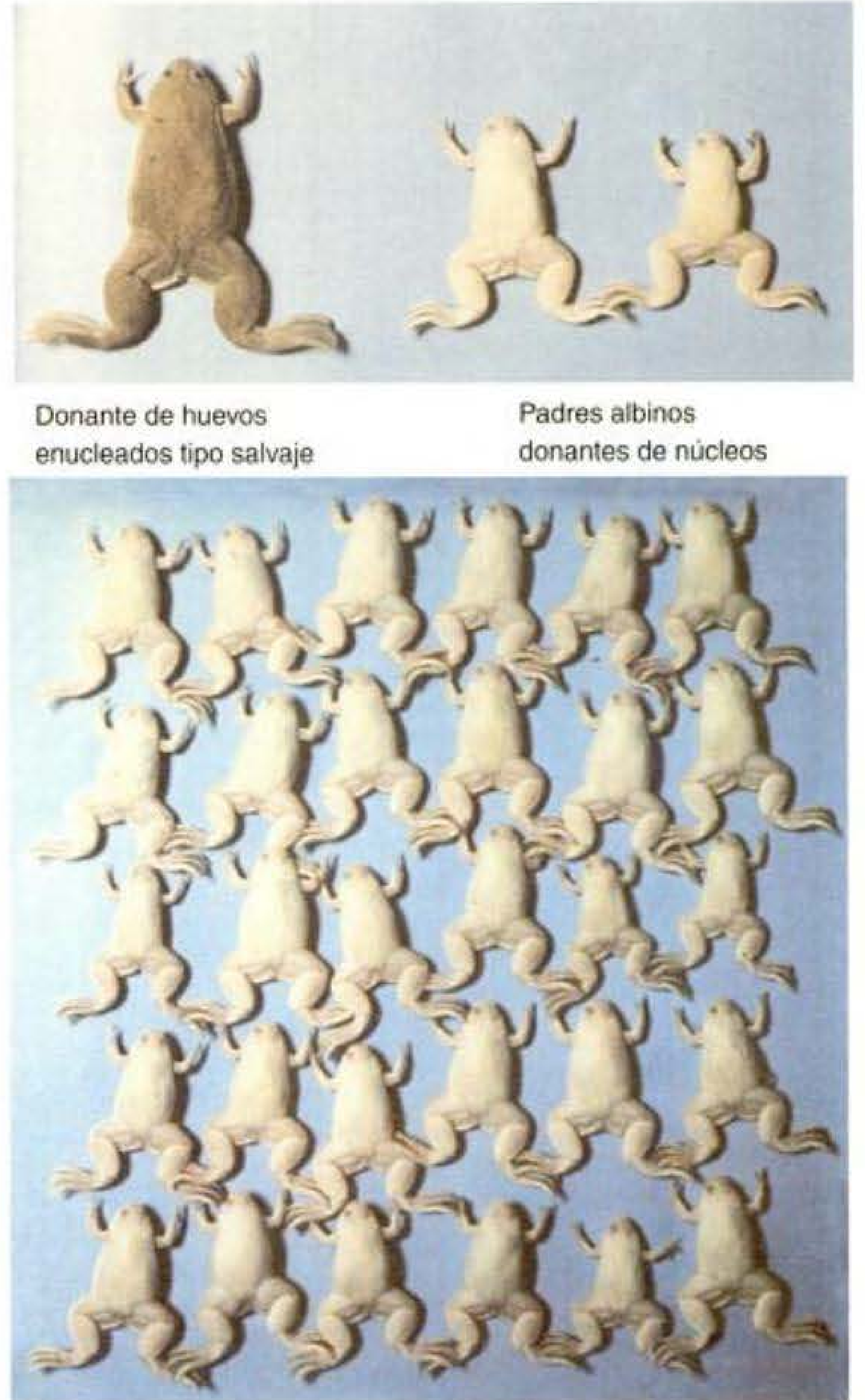


Fig. 4-7. Clon de ranas de *Xenopus laevis*. Los núcleos para todos los miembros del clon provinieron de un solo individuo; una hembra renacuajo en estadio de esbozo caudal cuyos padres (panel superior) estaban marcados por genes albinos. Los núcleos (con estos genes defectuosos de la pigmentación) fueron transferidos a huevos enucleados activados (gametos femeninos) de una hembra tipo salvaje (panel superior). Las ranas obtenidas fueron todas hembras y albinas (panel inferior). (Fotografías cortesía de J. Gurdon.)

SITIO WEB 4-3 **Clonación de anfibios: potencial y deformidad (Amphibian cloning: Potency and deformity).** La capacidad de un núcleo de anfibio para producir una rana normal ha sido un área polémica. Las definiciones sobre qué es un núcleo celular diferenciado y qué constituye una rana "normal" han sido cuestionadas.

SITIO WEB 4-4 **Metaplasia (Metaplasia).** Antes que la clonación llegara a ser posible, la evidencia para una equivalencia genómica provino del fenómeno denominado metaplasia, la regeneración de un tejido a partir de una fuente diferente.

Clonación de mamíferos

En 1997, Ian Wilmut anunció que una oveja había sido clonada a partir de un núcleo de una célula somática de una oveja hembra adulta. Ésta fue la primera vez que había sido clonado satisfactoriamente un vertebrado adulto a partir de otro adulto.* Para hacerlo, Wilmut y col. (1997) tomaron células de una glándula mamaria de una oveja embarazada adulta (6 años de edad) y las pusieron en cultivo. El medio de cultivo fue formulado para conservar los núcleos de estas células en una fase diploide intacta del ciclo celular (G_1). Esta fase del ciclo celular resultó ser crítica. Luego obtuvieron ovocitos a partir de ovejas de una raza diferente y les quitaron sus núcleos. Estos ovocitos tenían que encontrarse en la segunda metafase meiótica (la cual se corresponde con la fase en la que generalmente son fecundados). Como en el caso de las células somáticas (glándula mamaria), la fase del ciclo celular resultó ser un factor crítico para el éxito del procedimiento.

La fusión de la célula donante y del ovocito enucleado se llevó a cabo mediante el acercamiento de las dos células y el envío de un pulso eléctrico hacia ellas. El pulso eléctrico desestabilizó las membranas celulares, permitiendo a las células fusionarse. Además, el mismo pulso que fusionó a las células activó al ovocito a comenzar el desarrollo. Los embriones resultantes fueron finalmente transferidos al útero de una oveja embarazada.

De los 434 ovocitos de oveja utilizados originalmente en este experimento, solo uno sobrevivió: Dolly (fig. 4-8). El análisis de DNA confirmó que los núcleos de las células

* La creación de Dolly fue el resultado de una combinación de circunstancias científicas y sociales. Estas circunstancias involucraron seguridad en el empleo, el encuentro de personas con diferentes áreas de pericia, niños con vacaciones escolares, las políticas internacionales, y que tengan con quién sentarse cerca en un bar. Las complejas interconexiones que dieron origen a Dolly son explicadas en *La segunda creación* (Wilmut y col. 2000), un libro que puede ser leído por cualquiera que quiera conocer cómo trabaja realmente la ciencia contemporánea. Como Wilmut admitió (p. 36), "El relato puede parecer un poco desordenado, pero esto es así porque la vida es desordenada, y la ciencia es un trozo de la vida."

A



B

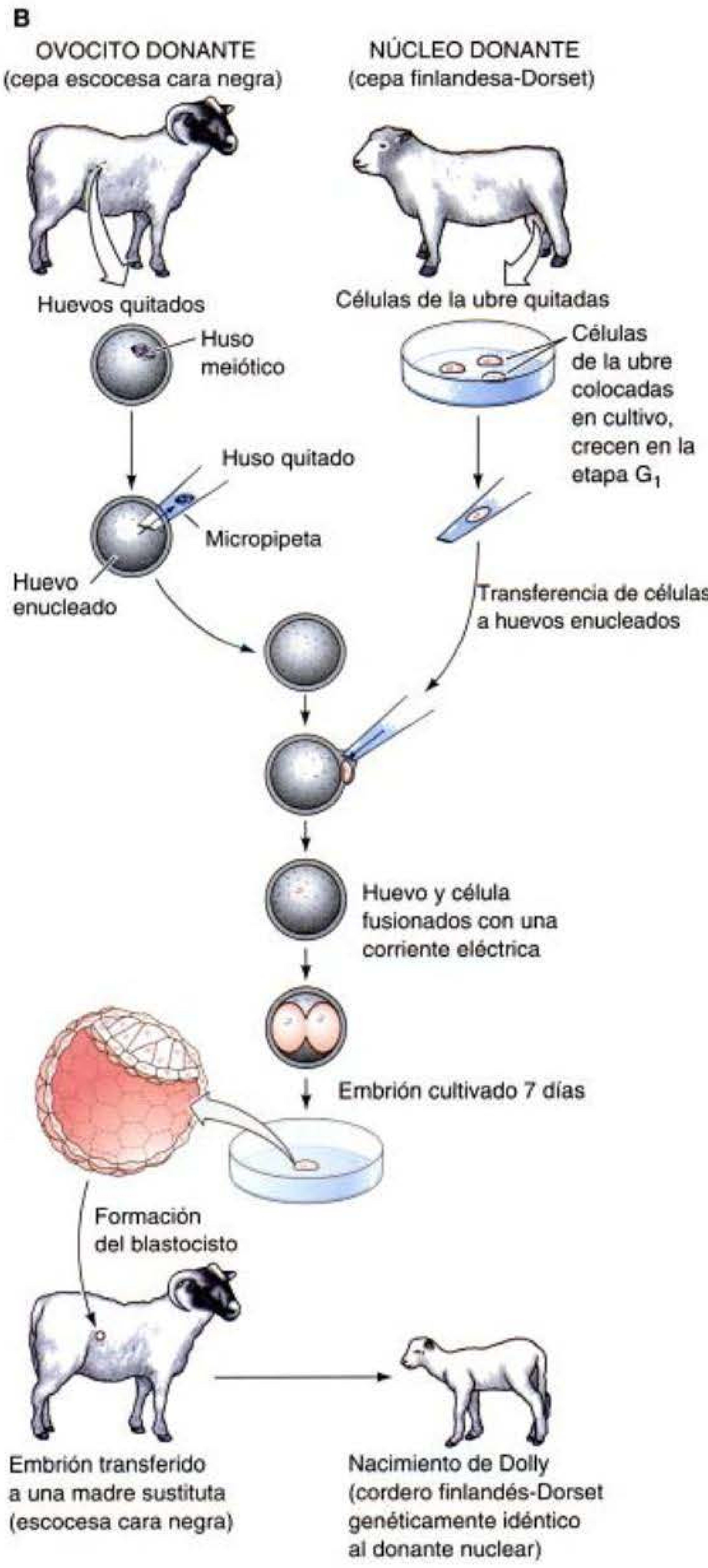


Fig. 4-8. Mamíferos clonados, cuyos núcleos provinieron de células somáticas adultas. **A.** Dolly, la oveja adulta sobre la izquierda, fue derivada por fusión de un núcleo de una célula de glándula mamaria con un ovocito enucleado, que luego fue implantado en una madre sustituta (de una oveja de raza diferente) que dio nacimiento a Dolly. Dolly desde entonces ha producido un cordero (Bonnie, a la derecha) mediante reproducción normal. **B.** Procedimiento utilizado para clonar ovejas. (A, fotografía por Roddy Field, © Roslin Institute; B, según Wilmut y col. 2000.)

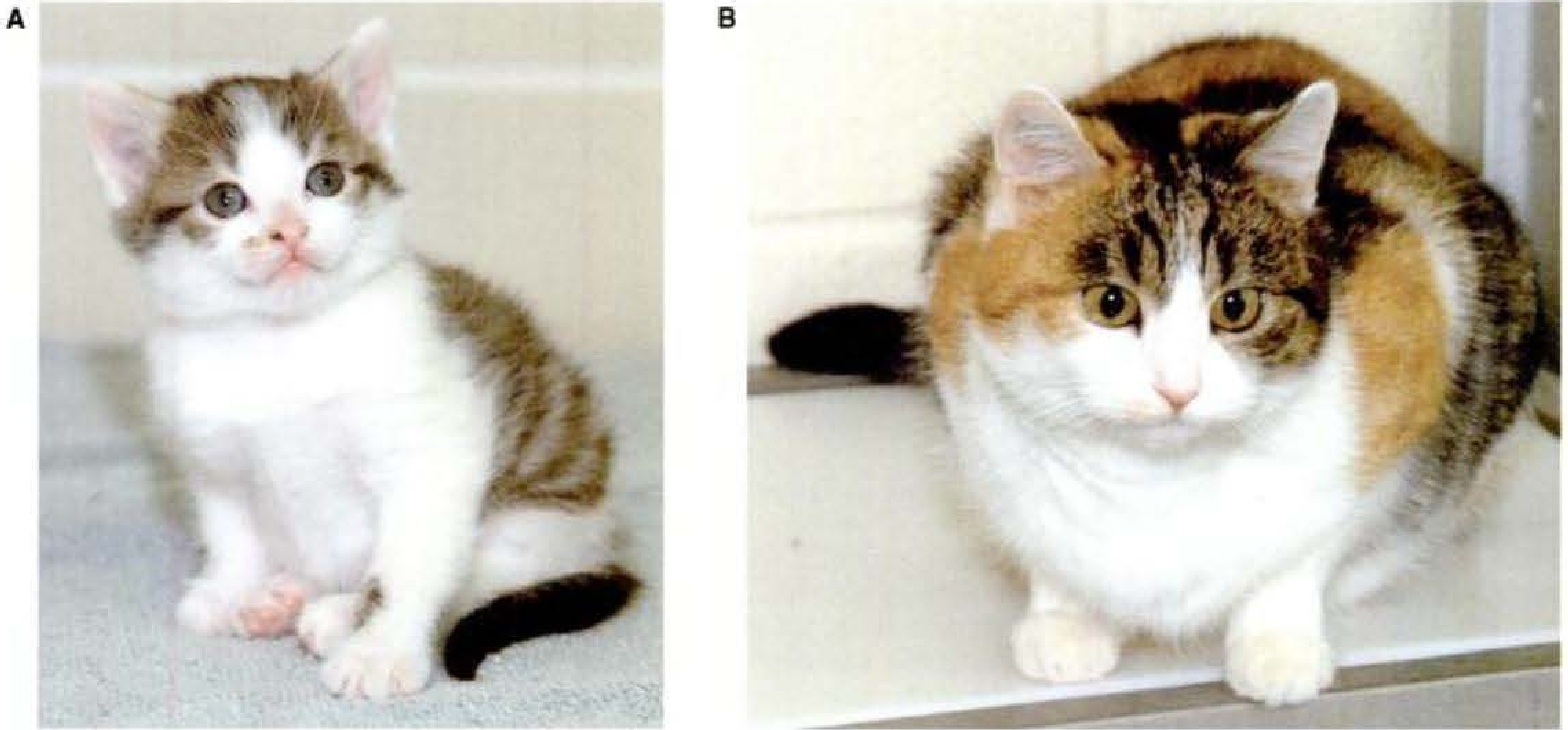


Fig. 4-9. El gatito "CC" (A) es un clon producido a partir de "Rainbow" (arco iris) (B) utilizando transferencia nuclear somática. Sus marcas no son idénticas debido a que el patrón de pigmentación en los gatos cálicos es afectado por la inactivación al azar del segundo cromosoma X (véase cap. 5). Sus comportamientos son también bastante diferentes. (Fotografías cortesía del College of Veterinary Medicine, Texas A y M University.)

de Dolly fueron derivados de la raza de ovejas de la cual fue tomado el núcleo donante (Ashworth y col. 1998; Signer y col. 1998). De este modo, parece que los núcleos de las células somáticas de los vertebrados adultos pueden en efecto ser totipotentes. Ninguno de los genes necesarios para el desarrollo se han perdido o han mutado en un sentido que los haya podido hacer no funcionales.

La clonación fue confirmada en vacas (Kato y col. 1998), ratones (Wakayama y col. 1998), gatos (Shin y col. 2002) y otros mamíferos. Sin embargo, algunas advertencias deberían ser informadas. Primero, aunque es aparente que todos los órganos estaban formados apropiadamente en los animales clonados, muchos de los clones desarrollaron enfermedades debilitantes a medida que maduraban (Humphreys y col. 2001; Jaenisch y Wilmut 2001; Kolata 2001). Segundo, el fenotipo de los animales clonados a veces no es idéntico al de los animales de los cuales derivó el núcleo. Hay una variabilidad debida a un acontecimiento cromosómico azaroso y a los efectos del ambiente. La pigmentación de los gatos cálicos (de algodón o estampados), por ejemplo, se debe a la inactivación al azar de uno o de otro cromosoma X en cada célula somática del embrión de gato hembra (será discutido en el siguiente capítulo). Por lo tanto, las manchas del primer gato clonado, un cálico denominado "CC," eran diferentes de aquellas del denominado "Rainbow" (arco iris), un gato cálico cuyas células proporcionaron el núcleo implantado que generó el clon (fig. 4-9). En ovejas clonadas, también el mismo genotipo da origen a múltiples fenotipos. Wilmut observó que cuatro ovejas clonadas a partir de núcleos de blastocisto del mismo embrión "son genéticamente idénticas entre sí y sin embargo son muy diferentes en tamaño y temperamento, mostrando categóricamente que los genes de los animales no 'determinan' cada uno de los detalles de su físico y de su personalidad" (Wilmut y col. 2000, p. 5). Wilmut concluyó que por esta y por otras razones, la "resurrección" por clonación de los amores perdidos no es factible. (La posibilidad de clonación de seres humanos será discutida en el capítulo 21.)

Información adicional y especulaciones

¿Por qué clonar mamíferos?

Teniendo en cuenta que en realidad sabemos a partir de los estudios de anfibios de la década de 1960 que los núcleos eran totipotentes, ¿por qué clonar mamíferos? Muchas de las razones son médicas y comerciales, y hay buenas razones para que estas técnicas hayan sido desarrolladas primero por compañías farmacéuticas en lugar de las universidades. La clonación es de interés para algunos biólogos del desarrollo que estudian las relaciones entre el núcleo y el citoplasma durante la fecundación o que estudian el proceso de envejecimiento (y la pérdida de la totipotencialidad que parece acompañar a éste), pero la clonación de mamíferos es de especial interés para la gente y corporaciones interesadas en la creación de proteínas farmacéuticas.

Las medicinas de proteína tales como insulina, inhibidores de proteasas y factores de coagulación son difíciles de elaborar. Debido a problemas de rechazo inmunológico, las proteínas humanas son generalmente mucho

mejor toleradas por los pacientes que las proteínas de otros animales. Del mismo modo, nosotros rechazamos los productos de genes humanos sintetizados en bacterias. Por esta razón, el problema llega a ser cómo obtener grandes cantidades de proteínas humanas. Una de los caminos más eficientes para producir estas proteínas es mediante la inserción de genes humanos que las codifican dentro del DNA de ovocitos de ovejas, cabras o vacas. Los animales que contienen un gen de otro individuo (a menudo de una especie diferente) –un **transgén**– son denominados **animales transgénicos**. Una hembra transgénica de oveja o de vaca no solo puede contener el gen para la proteína humana, sino que debe también ser capaz de expresar el gen en su tejido mamario y de este modo secretar la proteína en su leche (fig. 4-10; Prather 1991).

Sin embargo, la producción de ovejas transgénicas, vacas o cabras no es una tarea eficiente. Solo el 20% de los huevos (cigotos) tratados sobreviven a la técnica. De éstos, solo un 5% expresa el gen humano. Y de aquellos animales transgénicos expresando el gen humano, solo la mitad son femeninos, y solo un pequeño porcentaje de éstos secreta en realidad un alto nivel de la proteína en su leche. (Y esto a menudo toma años antes de su primera producción de leche.) Además, mueren después de varios años de producción de leche, y sus crías generalmente no son tan buenas secretoras de la proteína humana como las originales. La clonación podría permitir a las compañías farmacéuticas hacer numerosas copias de tal "elite de animales transgénicos," los cuales deberían producir altas cantidades de la proteína humana en su leche. La importancia médica de tal tecnología sería grande, debido a que tales proteínas llegarían a ser más baratas para los pacientes que las necesitan para sobrevivir. Los incentivos económicos para la clonación son por esta razón enormes (Meade 1997). Por lo tanto, poco tiempo después del anuncio de Dolly, el mismo laboratorio anunció el nacimiento de Polly (Schnieke y col. 1997). Polly fue clonada a partir de fibroblastos de oveja fetal transgénica que contenían el gen para el factor de coagulación humano IX, un gen cuya función es deficiente en la hemofilia hereditaria.

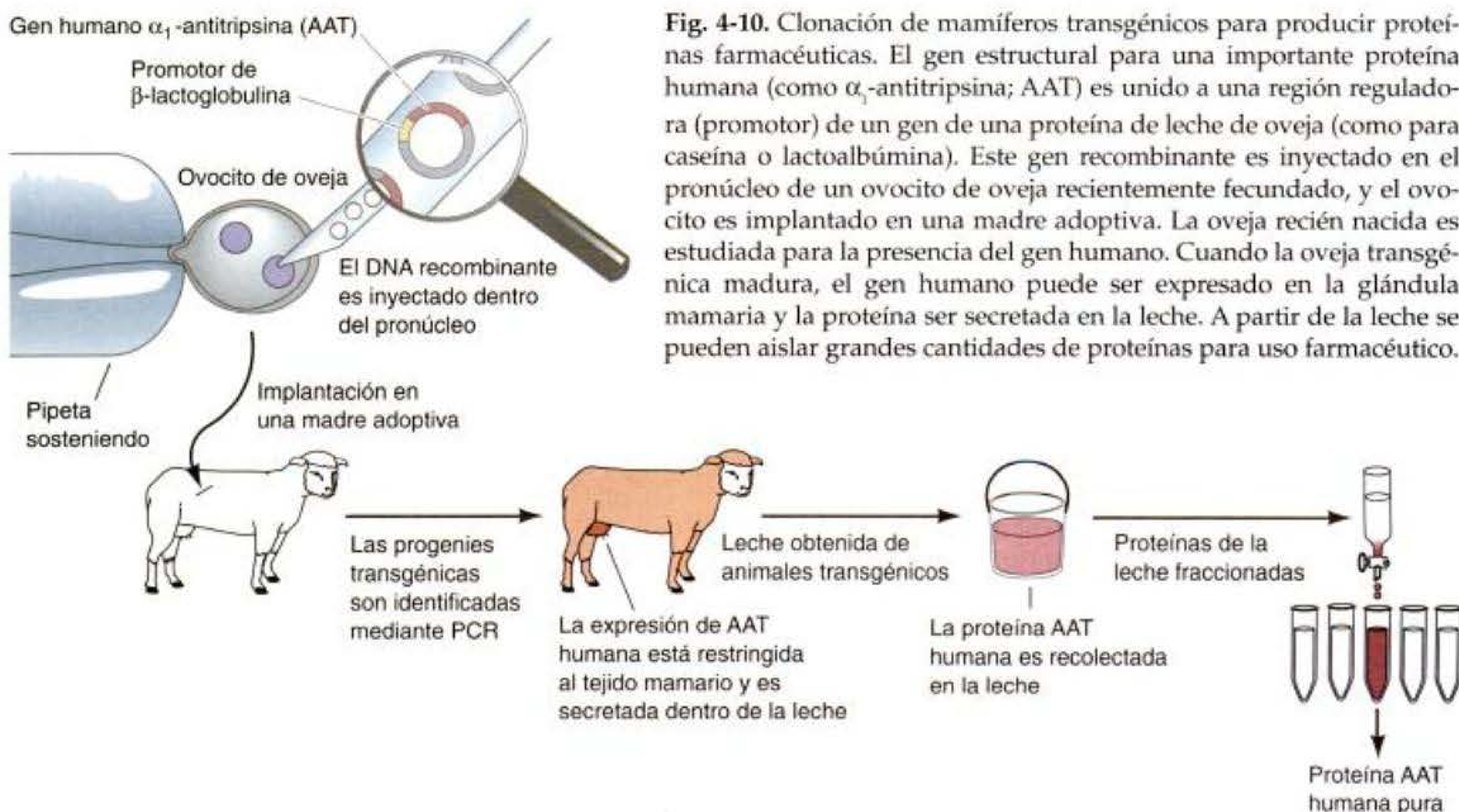


Fig. 4-10. Clonación de mamíferos transgénicos para producir proteínas farmacéuticas. El gen estructural para una importante proteína humana (como α_1-antitripsina; AAT) es unido a una región reguladora (promotor) de un gen de una proteína de leche de oveja (como para caseína o lactoalbúmina). Este gen recombinante es inyectado en el pronúcleo de un ovocito de oveja recientemente fecundado, y el ovocito es implantado en una madre adoptiva. La oveja recién nacida es estudiada para la presencia del gen humano. Cuando la oveja transgénica madura, el gen humano puede ser expresado en la glándula mamaria y la proteína ser secretada en la leche. A partir de la leche se pueden aislar grandes cantidades de proteínas para uso farmacéutico.

Información adicional y especulaciones

La excepción a la regla: genes de inmunoglobulina

Mientras que la regla es que el genoma es el mismo en cada una de las células del cuerpo, algunos glóbulos blancos que funcionan como parte del sistema inmune proporcionan excepciones a esta regla. El plasmocito (célula plasmática) es capaz de sintetizar proteínas denominadas **inmunoglobulinas** que pueden funcionar como anticuerpos. Durante décadas, los inmunólogos cavilaron sobre cómo el sistema inmune podría generar posiblemente tantos tipos diferentes de anticuerpos. ¿Podrían los 10 millones de tipos diferentes de proteínas de anticuerpos estar codificados en el genoma? Esto podría ocupar una enorme cantidad de espacio cromosómico. Además, ¿cómo podría hacer el sistema inmune para "saber" cómo hacer un anticuerpo para alguna molécula extraña (**antígeno**) que incluso no es encontrada fuera del laboratorio? Los investigadores descubrieron

finalmente que el genoma de las células B no contiene DNA que codifique cualquiera de las proteínas de anticuerpo. En su lugar, el DNA de la célula plasmática se reorganiza durante el desarrollo de la célula a partir de la célula B para crear los genes que codifican los anticuerpos. Además, mientras que los organismos de mamíferos tienen la capacidad de sintetizar cerca de 10 millones de tipos diferentes de proteínas de anticuerpos, cada una de las células plasmáticas puede sintetizar solo uno.

Todas las proteínas de inmunoglobulina tienen la misma estructura. Cada una consiste en dos pares de subunidades polipeptídicas. Hay dos **cadenas pesadas** idénticas y dos **cadenas livianas** idénticas; las cadenas están unidas mediante puentes disulfuro (fig. 4-11). La especificidad de la molécula de inmunoglobulina (es decir, si ésta se unirá a un poliovirus, una célula de *E. coli*, o algún otro antígeno) se determina por la secuencia de aminoácidos de las **regiones variables** de los extremos amino terminales de las cadenas pesadas y livianas. Las regiones variables de la molécula de inmunoglobulina están unidas a **regiones constantes** que le dan al anticuerpo las propiedades efectoras necesarias para inactivar al antígeno.

Los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina están organizados en segmentos. Los genes de las cadenas livianas de mamíferos poseen tres segmentos (fig. 4-11). El primer segmento del gen, V, codifica los primeros 97 aminoácidos de la región variable de la cadena liviana. En el genoma de ratón hay cerca de 300 secuencias V diferentes unidas una detrás de la otra. El segundo segmento, J, consiste en 4 o 5 secuencias posibles de DNA para los últimos 15-17 residuos de aminoácidos de la región variable. (Estos residuos son a menudo las regiones de contacto más importantes para unir el antígeno.) El tercer segmento del gen, C, codifica la región constante de la cadena liviana. Durante la diferenciación de la célula B a células plasmáticas, que se produce cuando las células B están madurando en la médula ósea, uno de los 300 segmentos V y uno de los 5 segmentos J se combinan para formar la región variable del gen del anticuerpo. Esto se lleva a cabo moviendo una secuencia del segmento V junto a la secuencia del segmento J; una reorganización que elimina el DNA interpuesto (Hozumi y Tonegawa 1976).

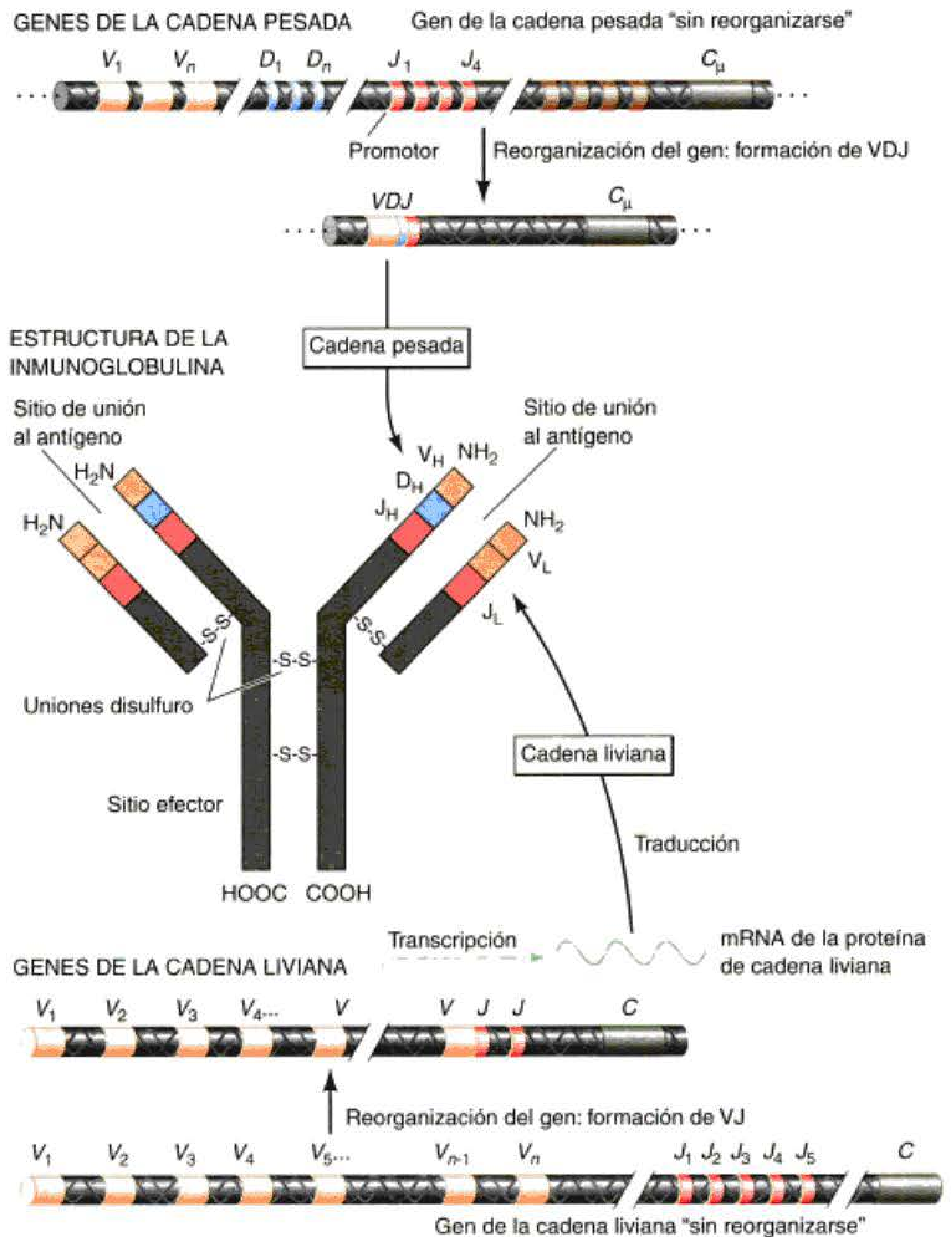


Fig. 4-11. (Centro) Estructura típica de una proteína de inmunoglobulina (anticuerpo). Dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas están conectadas por uniones disulfuro. El sitio de unión al antígeno está formado por las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas, mientras que el sitio efector del anticuerpo es determinado por la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada. (Abajo) Reorganización de los genes de cadena liviana durante la diferenciación del linfocito B. Mientras que la célula B en desarrollo está todavía madurando en la médula ósea, uno de los 300 o más segmentos del gen V se combina con uno de los 5 segmentos del gen J y se desplazan cerca del segmento del gen constante (C). (Arriba) Reorganización de los genes de la cadena pesada. Un gen de la cadena pesada contiene tres segmentos (V, D y J) que se reúnen para formar la región variable, así como una región constante.

Los genes de las cadenas pesadas contienen aún más segmentos que los genes de las cadenas livianas. Los genes de las cadenas pesadas incluyen un segmento V (200 secuencias diferentes para los primeros 97 aminoácidos), un segmento D (10-15 secuencias diferentes codifican 3-14 aminoácidos) y un segmento J (4 secuencias para los últimos 15-17 aminoácidos de la región variable). El siguiente segmento, C, codifica para la región constante. La región variable de la cadena pesada se forma uniendo un segmento V y un segmento D a un segmento J (fig. 4-11). Esta secuencia de región variable VDJ está ahora adyacente a la primera región constante de los genes de la cadena pesada, la región C_μ, que es específica para anticuerpos que pueden ser insertados dentro de la membrana celular.

Por lo tanto, una molécula de inmunoglobulina se forma por dos genes creados durante la fase antígeno independiente del desarrollo del linfocito B. Se pueden formar aproximadamente unos 10^3 genes de la cadena liviana diferentes y cerca de 10^4 genes de la cadena pesada diferentes. Debido a que cada uno es formado independientemente del otro, a partir de la unión de la cadena pesada y de la cadena liviana dentro de la células, se pueden crear cerca de 10^7 tipos de inmunoglobulinas diferentes. Cada célula produce solo uno de estos 10^7 tipos diferentes de anticuerpos.

La célula B no es el único tipo celular que altera su genoma durante la diferenciación. El otro tipo celular principal del sistema inmune, la célula T, también recombina y elimina una porción de su genoma para la construcción de su receptor de antígeno (Fujimoto y Yamagishi 1987). Las enzimas responsables de la mediación de estos acontecimientos de recombinación del DNA parecen ser las mismas en los linajes de las células B y T. Denominadas **recombinasas** (Agrawal y col. 1998; Bassing y col. 2002), estas dos proteínas reconocen las regiones señal de DNA inmediatamente corriente arriba para los segmentos de DNA recombinables y allí forman un complejo que comienza la rotura de la doble cadena. Además, los genes para estas enzimas recombinasas están activos únicamente en las células pre-B y pre-T, en las que los genes comienzan a ser recombinados.* Las mutaciones que eliminan la función de alguna de las recombinasas llevan a severos síndromes de inmunodeficiencias que son manifiestos al nacimiento (Schwarz y col. 1996; Villa y col. 1998).

SITIO WEB 4.5 **Formación de anticuerpos (Antibody formation).** Cómo hacen los genes de inmunoglobulinas para producir finalmente proteínas de anticuerpo es una historia fascinante, completa de excepciones a las reglas. Aquí se dan más detalles sobre las reorganizaciones del DNA.

* Se pensaba que las proteínas recombinasas se encontraban únicamente en los linfocitos, pero hay evidencia de eventos de recombinación y existe recombinasa en el tejido cerebral también (Chun y col. 1991; Matsuoka y col. 1991). No se conoce si sus funciones podrían ser en las células neurales, pero es fascinante especular que algunos de los receptores que unen un axón de las células nerviosas a su blanco específico podrían ser producidos mediante la recombinación de varias regiones del gen.

Expresión genética diferencial

Si el genoma es el mismo en todas las células somáticas dentro de un organismo (con excepción de los linfocitos; véase Información adicional y especulaciones), ¿cómo hacen las células para llegar a ser diferentes una de la otra? Si cada célula del cuerpo contiene los genes para las proteínas de hemoglobina y de insulina, ¿cómo las proteínas de hemoglobina son producidas únicamente en las células de los glóbulos rojos, las proteínas de insulina son producidas solamente en ciertas células del páncreas, y ninguna de ellas es producida en el sistema nervioso o en el riñón? Basado en la evidencia embriológica para la equivalencia genómica (así como en modelos bacterianos de regulación del gen), un consenso emergió en la década de 1960 en el cual las células se diferenciaban a través de la **expresión genética diferencial.** Los tres postulados de la expresión genética diferencial son los siguientes:

1. Cada núcleo celular posee el genoma completo establecido en el gameto femenino fecundado (célula huevo o cigoto). En términos moleculares, los DNA de todas las células diferenciadas son idénticos.
2. Los genes no utilizados en las células diferenciadas no son destruidos o mutados, y conservan su potencial para llegar a expresarse.
3. Únicamente un pequeño porcentaje del genoma es expresado en cada célula y una porción del RNA sintetizado en cada célula es específico para este tipo celular.

Los dos primeros postulados en realidad ya han sido discutidos. El tercer postulado –que solamente una pequeña porción del genoma es activa en la producción de productos específicos de tejido– fue examinado primero en larvas de insectos. Las larvas de la mosca de la fruta tienen algunas células cuyos cromosomas se convierten en **politénicos.** Estos cromosomas, amados por los genetistas de *Drosophila*, experimentan la replicación del DNA en la ausencia de mitosis y por esta razón contienen 512 (2^9), 1024 (2^{10}), o aún más dobles hélices paralelas de DNA en lugar de una (fig. 4-12A). Estas células no experimentan la mitosis y crecen al expandir cerca de 150 veces su volumen original. Beermann (1952) demostró que los patrones de bandeo de los cromosomas politénicos eran idénticos en toda la larva, y que no se puede encontrar pérdida ni adición de cualquier región cromosómica cuando son comparados diferentes tipos celulares. Sin embargo, él y otros demostraron que en diferentes tejidos, distintas regiones de estos cromosomas estaban produciendo mRNA específico de tejido. En ciertos tipos de células, regiones específicas de los cromosomas se relajarían, "hinchándose" y transcribiendo mRNA. En otros tipos celulares, estas regiones estarán "silenciosas," pero otras regiones se hincharán y sintetizarán mRNA.

La idea de que los genes de los cromosomas eran expresados diferencialmente en distintos tipos celulares fue confirmada utilizando hibridación DNA-RNA (fig. 4-12B). Esta técnica involucra hibridación de trozos de una única cadena de RNA y DNA para permitir a las cadenas complementarias formar un híbrido de doble cadena. Si uno de los ácidos nucleicos es marcado con un tinte o un trazador radiactivo, éste puede ser usado para indicar la presencia de sus complementos. Mientras que algunos mRNA a partir de un tipo celular fueron también encontrados en otros tipos celulares (como se esperaba para mRNA que codificaban enzimas involucradas en el metabolismo celular), se halló que muchos mRNA eran específicos para un tipo celular particular de la célula y que no eran expresados en

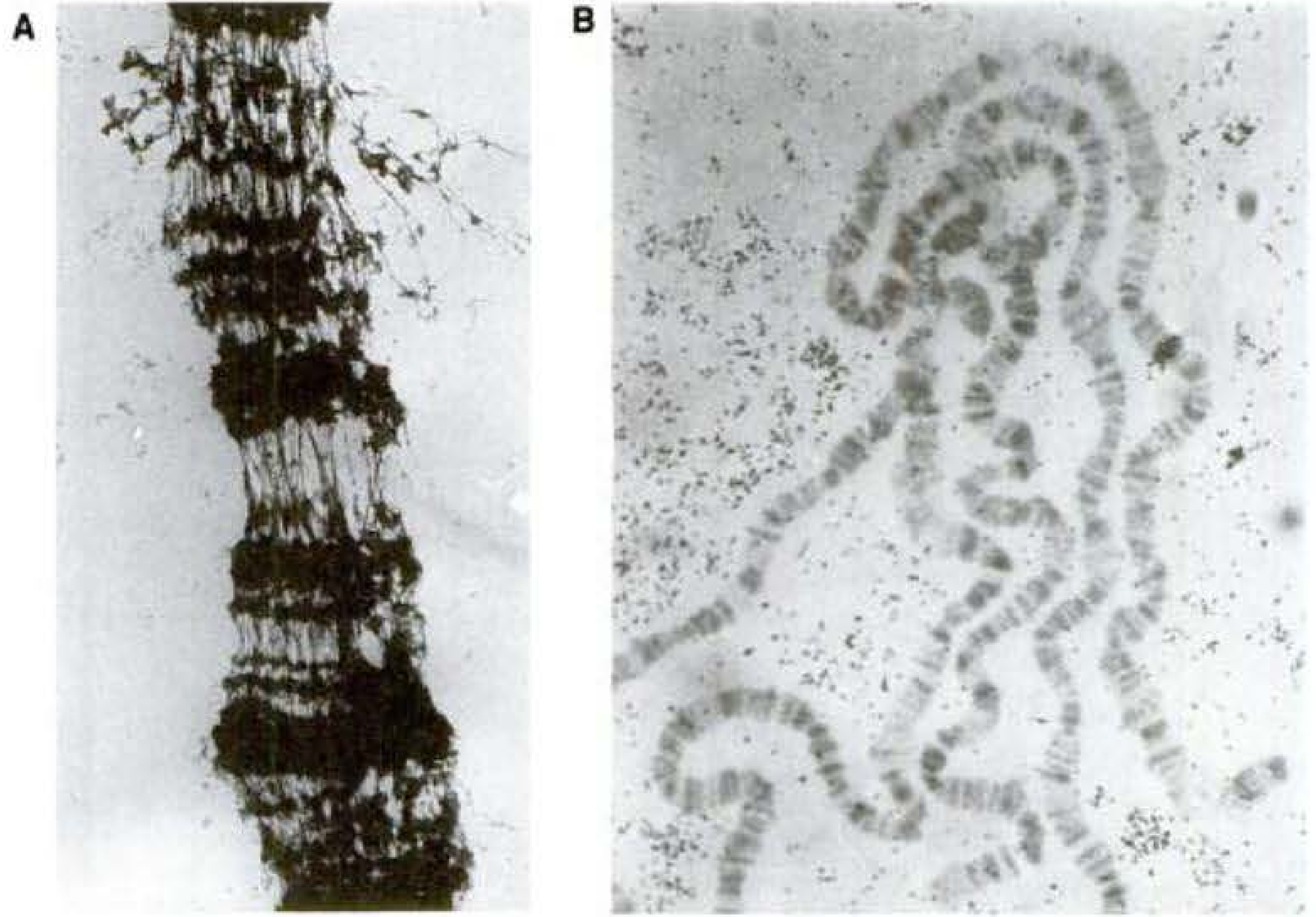


Fig. 4-12. Cromosomas politénicos. **A.** Microfotografía electrónica de una pequeña región de un cromosoma politénico de *Drosophila*. Las bandas (oscuras) están altamente condensadas comparadas con las regiones interbandas (más claras). **B.** Hibridación de un mRNA de una proteína de vitelo con el cromosoma politénico de una glándula salival de una larva de *Drosophila*. Los granos oscuros (flecha) muestran el sitio donde se ha unido al cromosoma el mensajero de la proteína de vitelo radiactiva. Nótese que el gen para la proteína de vitelo está presente en los cromosomas de las glándulas salivales, aun cuando la proteína de vitelo no es sintetizada aquí. (A, de Burkholder 1976, fotografía cortesía de G. D. Burkholder; B de Barnett y col. 1980; fotografía cortesía de P. C. Wensink.)

otros tipos celulares, incluso aunque los genes que los codifican estaban presentes (Wetmur y Davidson 1968). Así, la expresión genética diferencial demostró ser el camino a partir del cual un único genoma derivado del gameto femenino fecundado generaba en el cuerpo cientos de tipos celulares diferentes.

La pregunta luego se convirtió en ¿cómo se produce la expresión genética diferencial? Las respuestas a esta pregunta serán el tema del siguiente capítulo. Para entender los resultados que allí serán presentados, sin embargo, hay que familiarizarse con algunas de las técnicas de biología molecular que están siendo aplicadas para el estudio del desarrollo. Éstas incluyen técnicas para determinar la localización espacial y temporal de mRNA específicos, así como técnicas para determinar las funciones de estos mensajes.

SITIO WEB 4.6 **Técnicas de aislamiento de DNA (DNA isolation techniques).** Las técnicas básicas de análisis de DNA –clonación de genes, secuenciación y Southern blot– son discutidas en la mayoría de los textos de biología. Este sitio proporciona una revisión de estos procedimientos.

Técnicas de localización de RNA

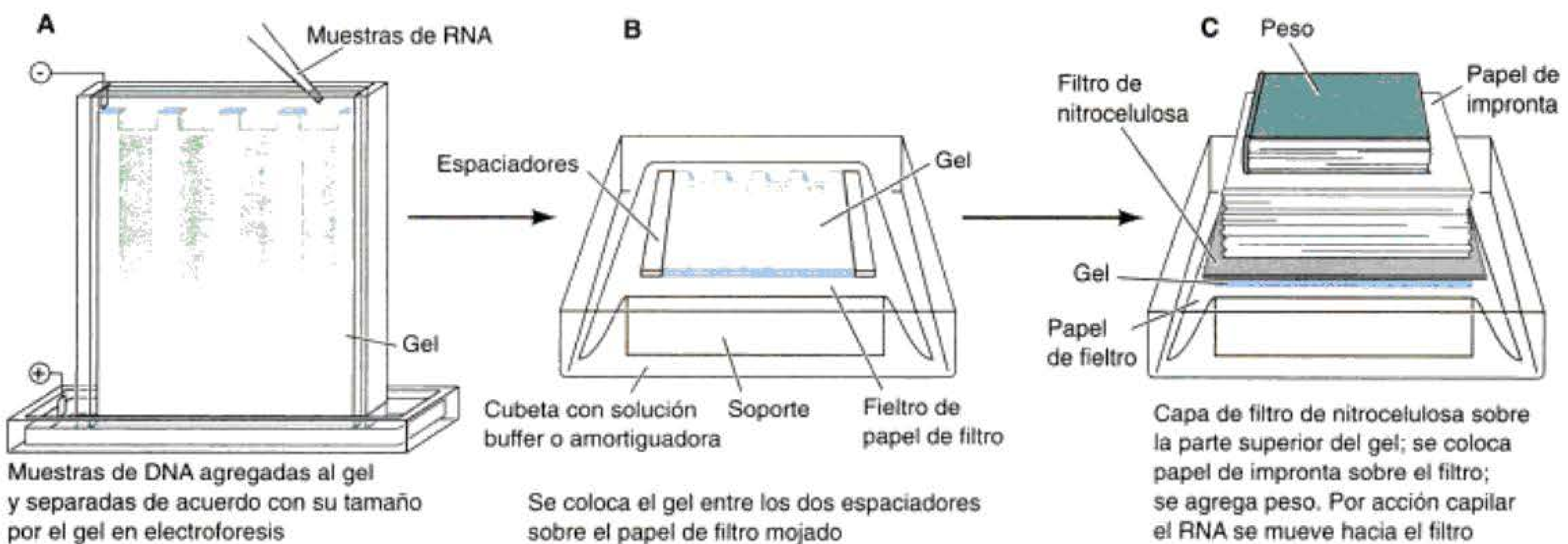
Northern blot

Se pueden determinar las localizaciones espaciales y temporales de expresión del RNA al "correr" una transferencia (blot) de RNA (a menudo denominado **Northern blot** –transferencia norteña–). En primer lugar, un investigador extrae RNA de embriones en diferentes etapas del desarrollo, o desde diferentes órganos del mismo embrión. A continuación, coloca estas muestras de RNA de lado a lado en un extremo del gel y hace correr una corriente eléctrica a través del gel. El RNA más pequeño, se mueve más rápidamente a través del gel. Así, diferentes RNA son separados por sus tamaños. Esta técnica es denominada **electroforesis**.*

El investigador luego transfiere los RNA separados a un papel de nitrocelulosa o a un filtro de membrana de nailon. El filtro con el RNA se incuba en una solución con un fragmento de DNA de cadena simple radiactivo de un gen en particular (fig. 4-13A). Esta sonda de DNA marcada radiactivamente se une solo a las regiones del filtro en las que está localizado el fragmento de RNA de interés (con el que éste es complementario). Si el mRNA para este gen está presente en una muestra, el DNA marcado se unirá a éste y podrá ser detectado mediante autorradiografía. Una película de rayos X es colocada debajo del filtro e incubada en la oscuridad. La radiactividad localizada en la sonda reduce la plata en la película de rayos X y se forman granos. Las manchas o marcas resultantes, que aparecen directamente por arriba de los lugares donde el DNA radiactivo se ha unido, aparecen negras cuando se las observa directamente. Las autorradiografías de este tipo, en las que a partir de RNA de varias fases de desarrollo o tejidos son comparados simultáneamente, son denominadas **Northern blot del desarrollo**.

La figura 4-13F muestra un Northern blot del desarrollo utilizado para investigar la expresión de la proteína Pax6 en el embrión de mamífero. Pax6 es crítica para el desarrollo normal del ojo; las mutaciones en el gen *Pax6* resultan en ojos pequeños (en ratones heterocigotas) o sin ojos o nariz (en ratones o humanos homocigotas para la mutación de pérdida de función). El Northern blot muestra que este gen es expresado en el embrión en el cerebro, ojos y páncreas, sin hacerlo en ningún otro tejido más.

* Dada la misma carga en proporción a la masa, los pequeños fragmentos de RNA obtienen mayor velocidad que los más grandes cuando son impulsados por la misma energía (es decir, los fragmentos más grandes se mueven más lentamente que los más pequeños). Esta propiedad es una función de la ecuación de energía cinética, $E= 1/2\ mv^2$. Resolviéndolo para la velocidad, encontramos que la velocidad es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la masa.



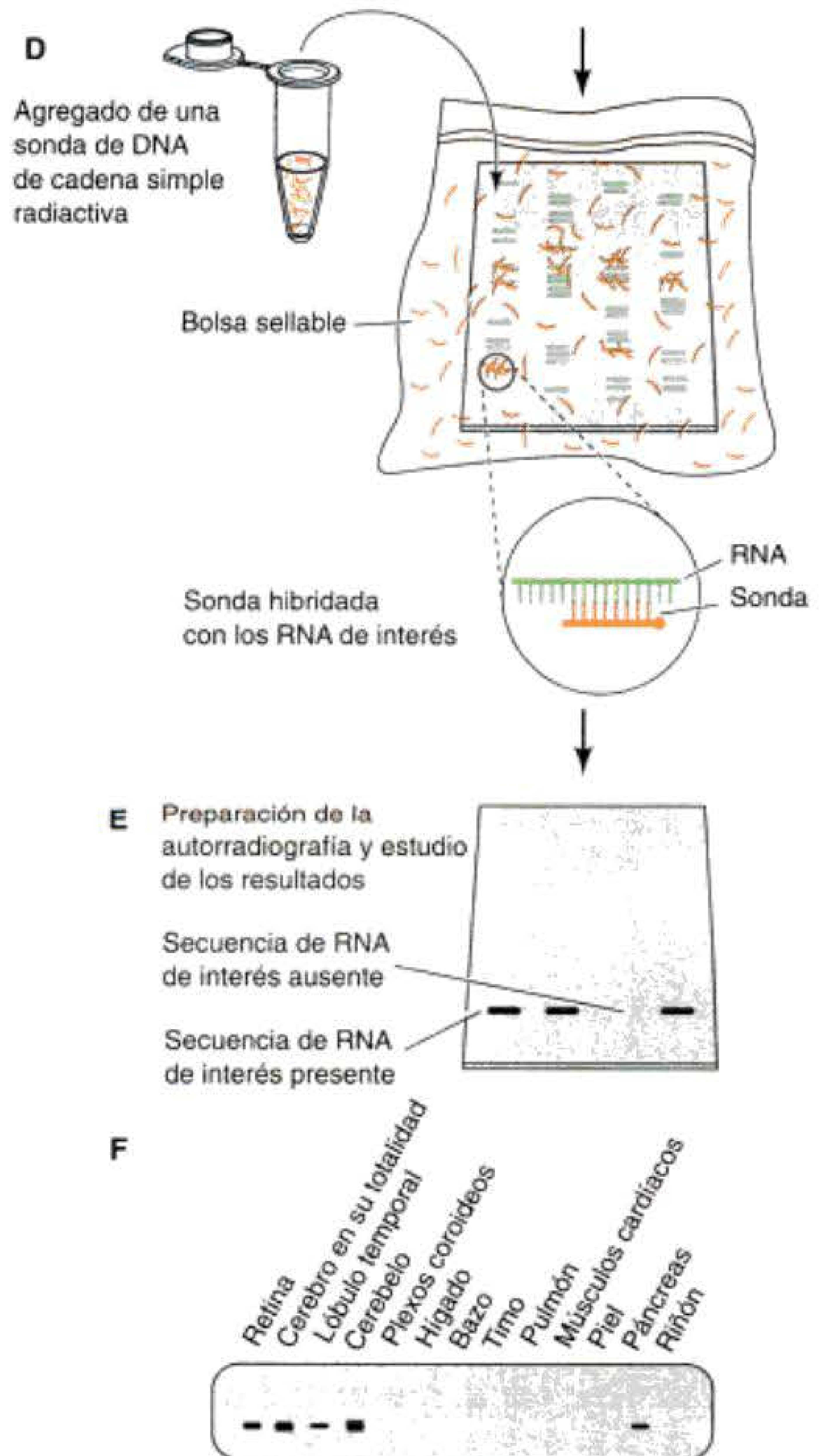


Fig. 4-13. Northern blot del desarrollo. (A–E) Procedimiento para Northern blot. **A.** El RNA es aislado a partir de varios tejidos y es separado por tamaño utilizando un gel en electroforesis. **B.** El gel es luego colocado sobre un papel de fieltro, que absorbe una solución iónica a través de éste. **C.** Un filtro que atrapa RNA es colocado por arriba del gel, y un papel de impronta es colocado por arriba del filtro. La acción capilar extrae la solución a través del gel, atrapando el RNA sobre el filtro. **D.** El filtro es incubado con una cadena simple de DNA complementario radiactiva para el mRNA de interés. **E.** Luego que todo el DNA que no se ha unido es lavado, la autorradiografía localiza el mRNA en las muestras que lo contienen. **F.** Dibujo de un Northern blot del desarrollo que muestra la presencia del mRNA Pax6 en el ojo, cerebro y páncreas de un embrión de mamífero. (F, según Ton y col. 1991.)

Transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR** –del inglés *polimerase chain reaction*) es un método de clonación de genes in vitro* que puede generar enormes cantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de una pequeña cantidad de material de partida (Saiki y col. 1985). Ésta puede utilizarse para clonar un gen específico o para determinar si un gen específico está transcribiendo activamente mRNA en un órgano o tipo celular en particular. Los métodos estándares de clonación de genes utilizan microorganismos vivos para amplificar al DNA recombinante. La técnica de PCR, sin embargo, puede amplificar un único segmento de una molécula de DNA varios millones de veces en pocas horas, y puede hacerlo en un tubo de ensayo. Las técnicas de PCR son extremadamente útiles en casos en los que hay muy poca muestra para estudiar.

Los embriones de ratón de preimplantación, por ejemplo, tienen muy poco mRNA, y no se pueden obtener millones de estos embriones para estudiar. Si se quiere saber si un único embrión de ratón preimplantado contiene el mRNA para una proteína específica, sería muy dificultoso encontrarla utilizando los métodos estándares; se tendrían que lisar miles de embriones de ratón con la finalidad de obtener suficiente cantidad de mRNA. Sin embargo, mediante la combinación de técnicas de PCR con la capacidad de la enzima **transcriptasa inversa (RT** –del inglés *reverse transcriptase*) para producir DNA a partir del mRNA, se puede evitar el problema de la escasez de mensajeros. La técnica de **RT-PCR** (del inglés *r*everse *t*ranscriptase-*polimerase chain r*eaction) permite convertir el mRNA en DNA y copiar la secuencia de DNA específica de interés (Rappolee y col. 1988).

* La clonación de genes –producción de numerosas copias de la misma secuencia de DNA– no debe confundirse con la clonación de organismos –producción de copias genéticamente idénticas de un organismo.

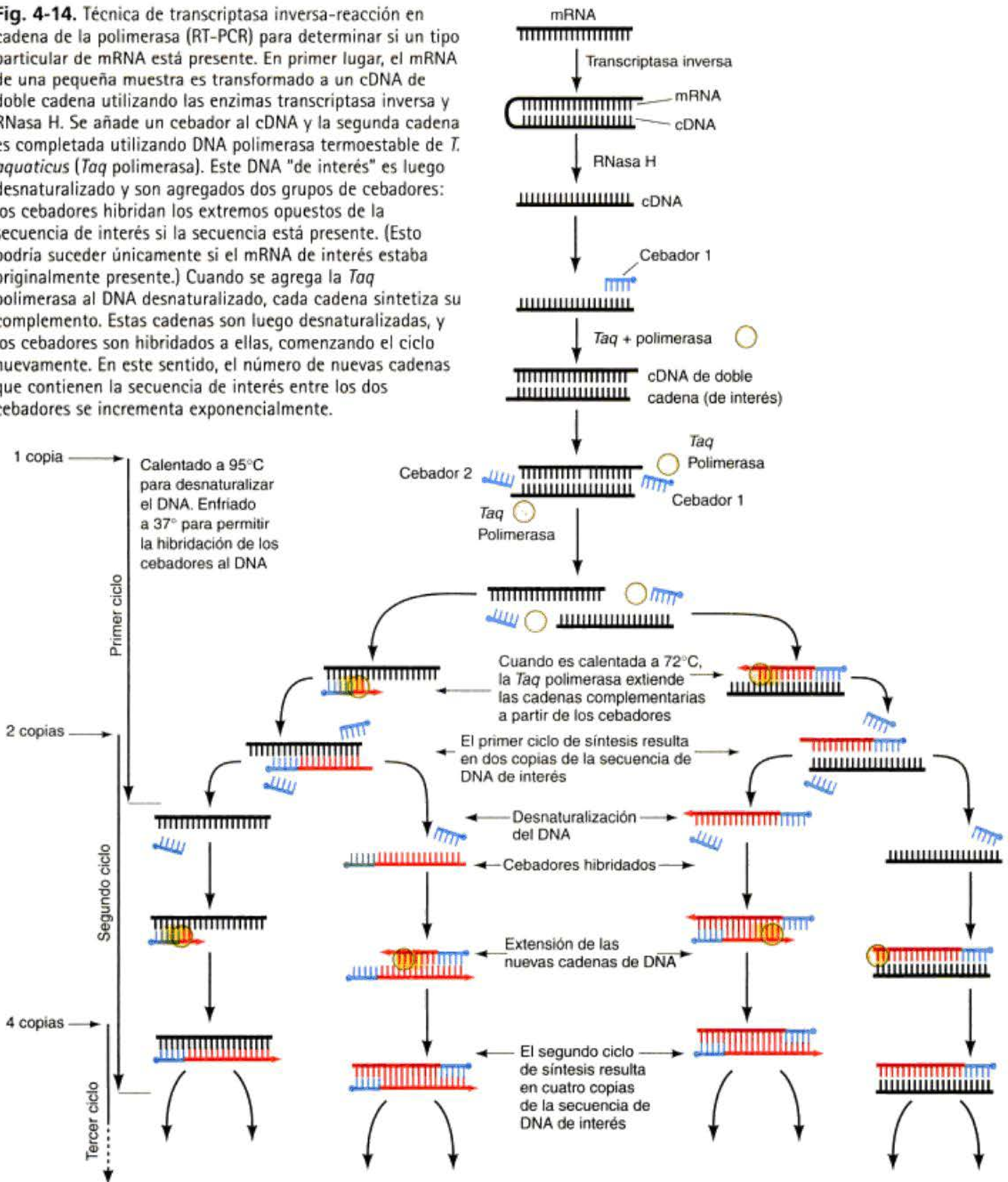
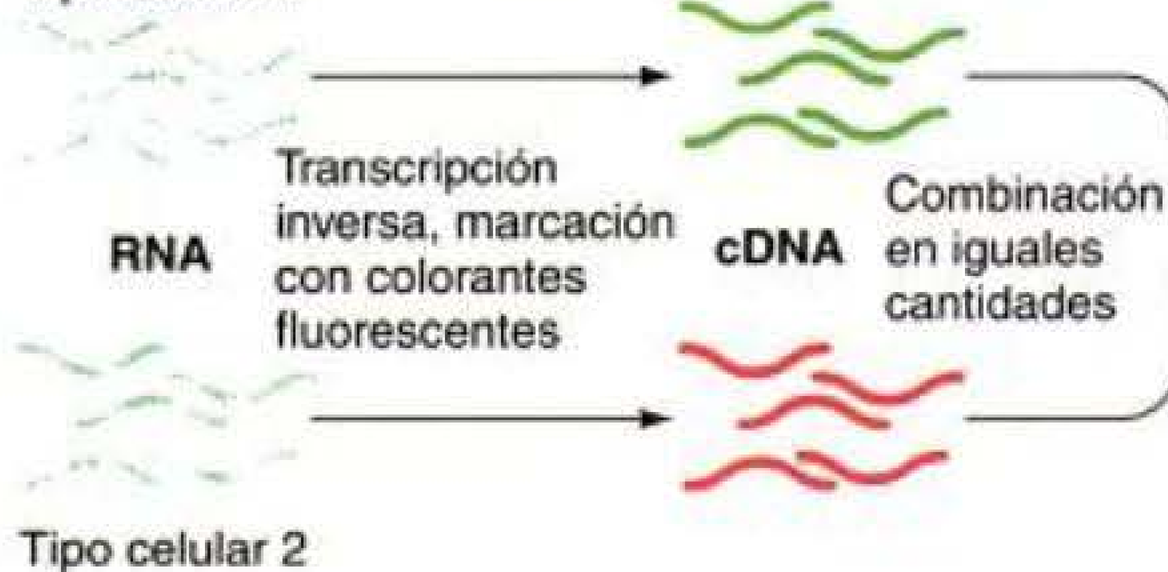
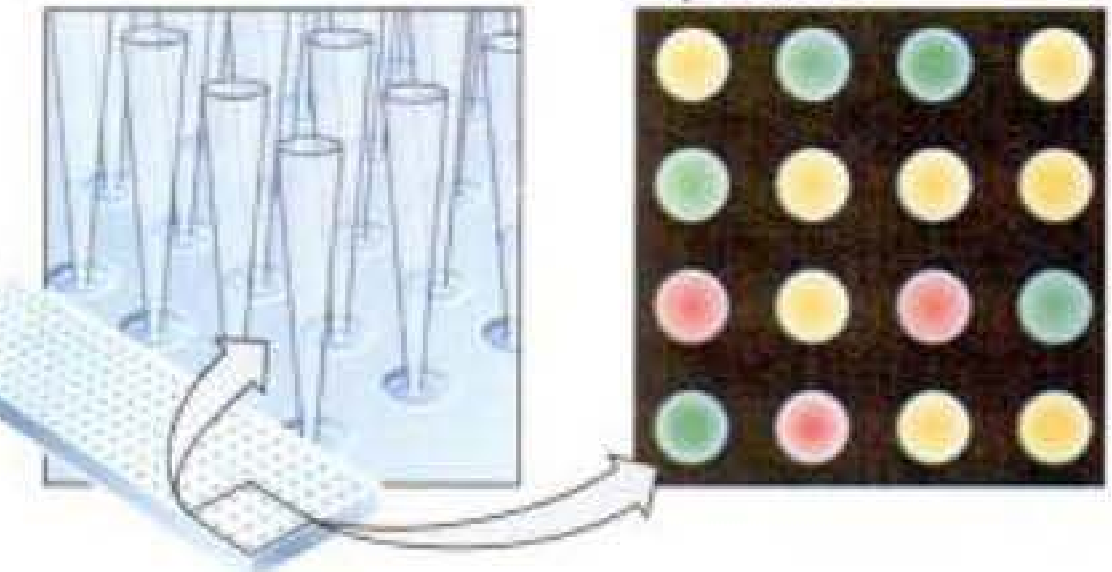


Fig. 4-14. Técnica de transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para determinar si un tipo particular de mRNA está presente. En primer lugar, el mRNA de una pequeña muestra es transformado a un cDNA de doble cadena utilizando las enzimas transcriptasa inversa y RNasa H. Se añade un cebador al cDNA y la segunda cadena es completada utilizando DNA polimerasa termoestable de *T. aquaticus* (*Taq* polimerasa). Este DNA "de interés" es luego desnaturalizado y son agregados dos grupos de cebadores: los cebadores hibridan los extremos opuestos de la secuencia de interés si la secuencia está presente. (Esto podría suceder únicamente si el mRNA de interés estaba originalmente presente.) Cuando se agrega la *Taq* polimerasa al DNA desnaturalizado, cada cadena sintetiza su complemento. Estas cadenas son luego desnaturalizadas, y los cebadores son hibridados a ellas, comenzando el ciclo nuevamente. En este sentido, el número de nuevas cadenas que contienen la secuencia de interés entre los dos cebadores se incrementa exponencialmente.

El uso de RT-PCR para encontrar mRNA poco comunes es representado en la figura 4-14. En primer lugar, los mRNA de una muestra son purificados y convertidos en DNA complementario (cDNA) utilizando la enzima RT. En el siguiente paso, un cDNA específico es elegido para amplificación. Dos pequeños oligonucleótidos cebadores (primers) que son complementarios para una porción del mensaje buscado y son añadidos a la población de cDNA. Los oligonucleótidos son extensiones de DNA relativamente cortas (cerca de 20 bases). Si los oligonucleótidos se unen a secuencias en el cDNA, esto significa que el mRNA que está siendo buscado se encuentra presente en la muestra original. Los cebadores de oligonucleótidos son hechos de modo tal que hibridan a cadenas opuestas en extremos opuestos de la secuencia de interés. (Si estamos tratando de aislar el gen o al mRNA para una proteína específica de secuencia conocida, se pueden sintetizar oligonucleótidos que son complementarios a las secuencias que codifican el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal de la proteína.) Los extremos 3' de los cebadores se enfrentan entre sí, de modo tal que la replicación se producirá a lo largo del DNA de interés.





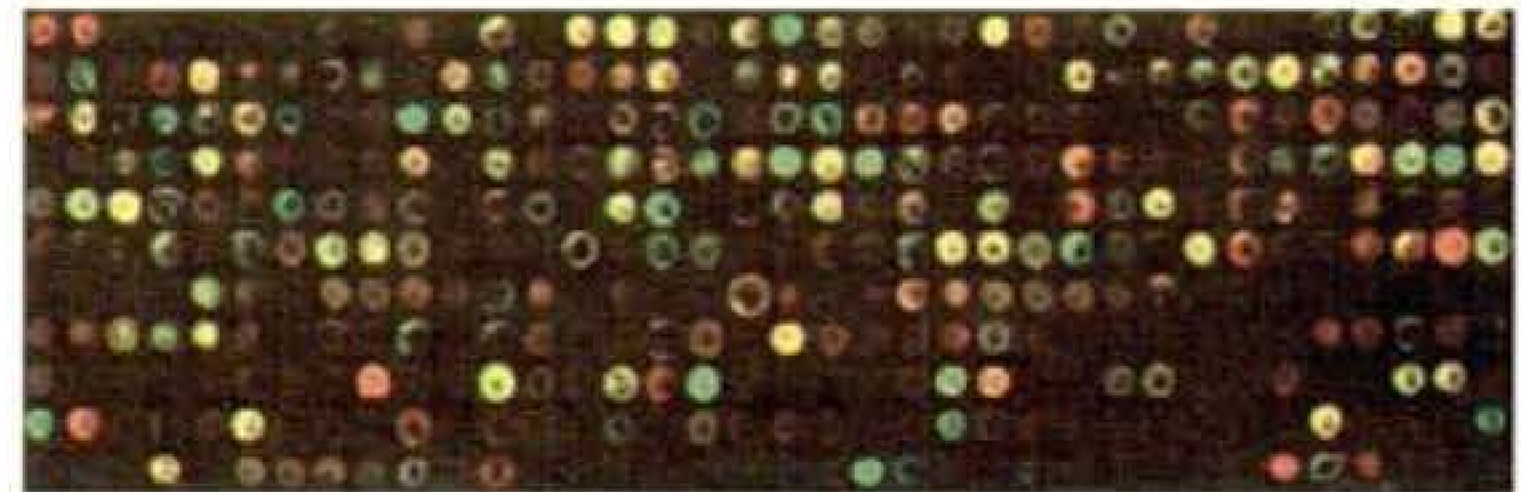


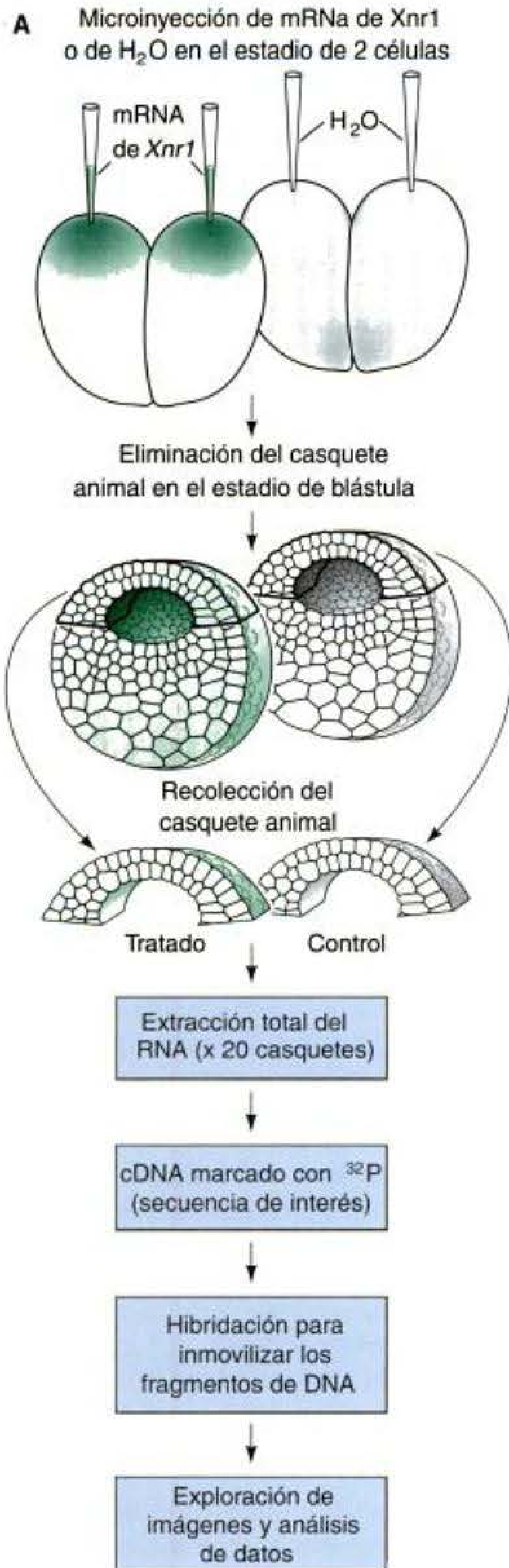
Fig. 4-15. Técnica de micromatriz. Los mRNA "de interés" son preparados mediante aislamiento de mRNA a partir de dos tipos celulares a ser comparados (dos tipos celulares diferentes o el mismo tipo celular a diferentes tiempos), produciendo DNA complementarios a partir de ellos y agregando dos tipos diferentes de marcadores fluorescentes (un color para cada tipo celular). En este caso, los cDNA de la célula tipo 1 están marcados con un colorante verde, mientras que los cDNA del tipo celular 2 son marcados con un colorante rojo. Las sondas de las micromatrices son producidas al tomar un número de cDNA diferentes generados a partir de mRNA de un tipo celular y adhiriéndolas a un portaobjetos de cristal del microscopio. Se hibridan las sondas y la secuencia de interés. Si el mRNA en una sonda es abundante en la célula tipo 1, la señal es verde. Si el mRNA es abundante en una célula tipo 2, la señal es roja. Si el mRNA está presente en ambos tipos celulares, la señal es amarilla. El extremo inferior muestra una porción de tal micromatriz. (De http://www.genetics.ucla.edu/microarray/instruction.html)

Una vez que el primer cebador se ha hibridado con el cDNA, la DNA polimerasa puede utilizarse para sintetizar una nueva cadena. La DNA polimerasa utilizada en este proceso es obtenida a partir de bacterias termófilas (que aman el calor), como *Thermus aquaticus* o *Thermococcus littoralis*. Estas bacterias viven en manantiales calientes (como los del Parque Nacional de Yellowstone) o en respiradores térmicos submarinos, en donde la temperatura alcanza cerca de 90ºC. Estas DNA polimerasas pueden soportar temperaturas cercanas a la ebullición, y la RT-PCR toma la ventaja de esta adaptación evolutiva. Una vez que es producida la segunda cadena de DNA, éste es desnaturalizado de su complementario por calor. (La temperatura utilizada inactivaría a la DNA polimerasa más frecuente de *E. coli*, pero las polimerasas termoestables no resultan dañadas.)

El segundo cebador es añadido, y ahora ambas cadenas pueden sintetizar nuevo DNA. Los ciclos repetidos de desnaturalización y síntesis amplifican la secuencia de DNA exponencialmente. Después de 20 de estas rondas, la secuencia específica ha sido amplificada 2^{20} veces (un poco más que un millón). Cuando el DNA es sometido a electroforesis, la presencia de tal fragmento amplificado se detecta fácilmente. Su presencia muestra que había un mRNA con la secuencia de interés presente en la muestra original.

Micromatrices (microarrays) y macromatrices (macroarrays)

Northern blot funciona sobre la base de un "solo gen en un experimento", lo que significa que el "cuadro total" de la expresión diferencial del gen entre las células o tejidos es difícil de obtener. En los últimos años, una nueva tecnología, denominada **micromatrices de DNA (microarrays;** técnica también conocida como **"DNA-chip,"** aunque esta última en realidad constituye otra variante), ha permitido a los científicos observar los cambios en la transcripción de miles de genes simultáneamente (Wan y col. 1996). Las micromatrices combinan tecnología de Northern blot y PCR con robótica de alta velocidad. En primer lugar, se toma mRNA de un tejido y se transforman los mRNA en sus DNA complementarios (utilizando transcriptasa inversa). Cada cDNA individual puede luego ser clonado, desnaturalizado y amplificado por PCR. Los cDNA resultante sirven como sondas en las micromatrices. Cada una de estas sondas de clon de cDNA es robóticamente impresa sobre portaobjetos de vidrio en un orden específico, y los portaobjetos son posteriormente hibridados para dos "objetivos de interés" con diferentes marcadores fluorescentes. Estos objetivos de interés constituyen un fondo común de cDNA que son generados después de aislar el mRNA a partir de las células o tejidos en dos estados que se desean comparar. Por ejemplo, si el objetivo es comparar el tipo celular A con el tipo celular B, se deberían tomar mRNA de ambos tipos celulares, transformar los mRNA en cDNA y marcar los cDNA del tipo celular A con fluoresceína (verde) y los cDNA del tipo celular B con rodamina (rojo). Los dos fondos comunes de DNA deben ser luego mezclados equitativamente, y la mezcla debe ser colocada sobre cada sitio del portaobjetos en el que se encuentra la sonda de cDNA. Las intensidades fluorescentes obtenidas son producidas utilizando un láser de microscopio fluorescente confocal, y la información de las proporciones es obtenida siguiendo el procesamiento de imágenes. Mediante la comparación de las intensidades fluorescentes, se puede decir si un cDNA específico (y por lo tanto, el mRNA de interés) está presente en grandes cantidades en un tipo celular u otro (fig. 4-15).



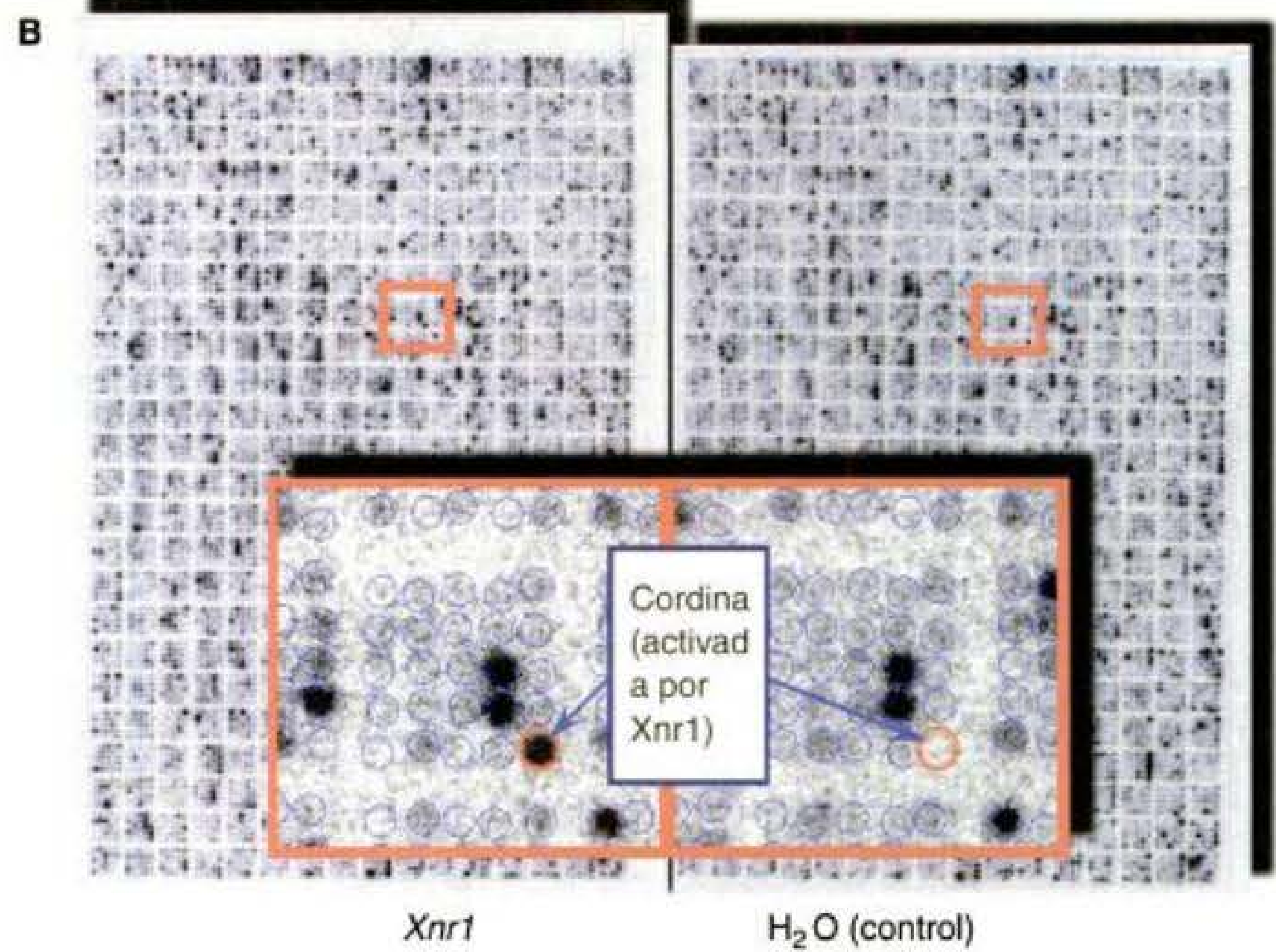


Fig. 4-16. Análisis de macromatriz de los genes cuya expresión en el embrión temprano de *Xenopus* es provocada por la proteína tipo activina relacionada con Nodal 1 (Xnr1). **A.** Creación de secuencias de interés para análisis por macromatrices. **B.** En las macromatrices, algunas manchas radiactivas (representación de hibridaciones) fueron vistas en la muestras de células Xnr1 estimuladas, pero no en las células control. Estas manchas representan los genes activados por Xnr1; el recuadro muestra uno de éstos, el gen *cordina* (*chordin*). La mayor parte de los miles de genes observados no estaban activados. El DNA de las manchas hibridadas puede ser secuenciado e identificado. (Fotografías cortesía de N. Ueno.)

Por ejemplo, se pueden examinar los genes activos de la parte dorsal futura de una blástula de rana y compararlos con los genes activos de la porción ventral futura de la misma blástula (Altmann y col. 2001). De manera alternativa, se puede examinar al animal entero en diferentes etapas de su desarrollo para ver qué genes son activos en cada etapa (White y col. 1999). Esto permite centrar la investigación sobre aquellos genes cuya expresión difiere entre los dos grupos de cDNA.

Además de permitir analizar miles de genes al mismo tiempo, las micromatrices tienen otra importante ventaja sobre los Northern blot. Los mRNA poco comunes no son dejados fuera de competencia por especies de mRNA frecuentes, y esto permite que puedan ser encontrados aquellos mensajeros que están presentes en pequeñas cantidades.

Una modificación menos costosa de la micromatriz es la **macromatriz (macroarray)**. La tecnología es similar, pero los sitios para las sondas de cDNA del portaobjetos son más grandes (cerca de 1 mm con respecto a los 250 µm). Esto significa que las macromatrices pueden ser interpretadas visualmente sin un microscopio, y que pueden ser utilizados los radioisótopos como también los marcadores fluorescentes. Por ejemplo, en el capítulo 3 se dijo que la activina causa la expresión de ciertos genes en el casquete animal de *Xenopus*. Uno de los componentes tipo activina que se producen naturalmente que es encontrado en los embriones tempranos de *Xenopus* es denominado relacionado a Nodal 1 de *Xenopus* (Xnr1 –del inglés *Xenopus Nodal related 1*). Para ver si Xnr1 activa a otros genes específicos, el laboratorio de Naoto Ueno inyectó mRNA de *Xnr1* en algunos embriones tempranos pero no en otros. A continuación recolectaron mRNA de los casquetes animales de los embriones secretores de Xnr1 y de los controles. (El casquete animal no sería expuesto a Xnr1 durante el desarrollo normal.) Luego de transformar a los mRNA en cDNA marcados radiactivamente, Ueno y col. hibridaron estas sondas a portaobjetos que contenían el DNA unido. Una macromatriz fue hibridada con cDNA de los casquetes de animales control; una macromatriz idéntica fue hibridada con cDNA radiactivos de casquetes tratados con Xnr1. Uno de los resultados se muestra en la figura 4-16. Aquí, se ve que el gen para cordina se expresa en el casquete animal tratado, mientras que no lo hace en el casquete no tratado.

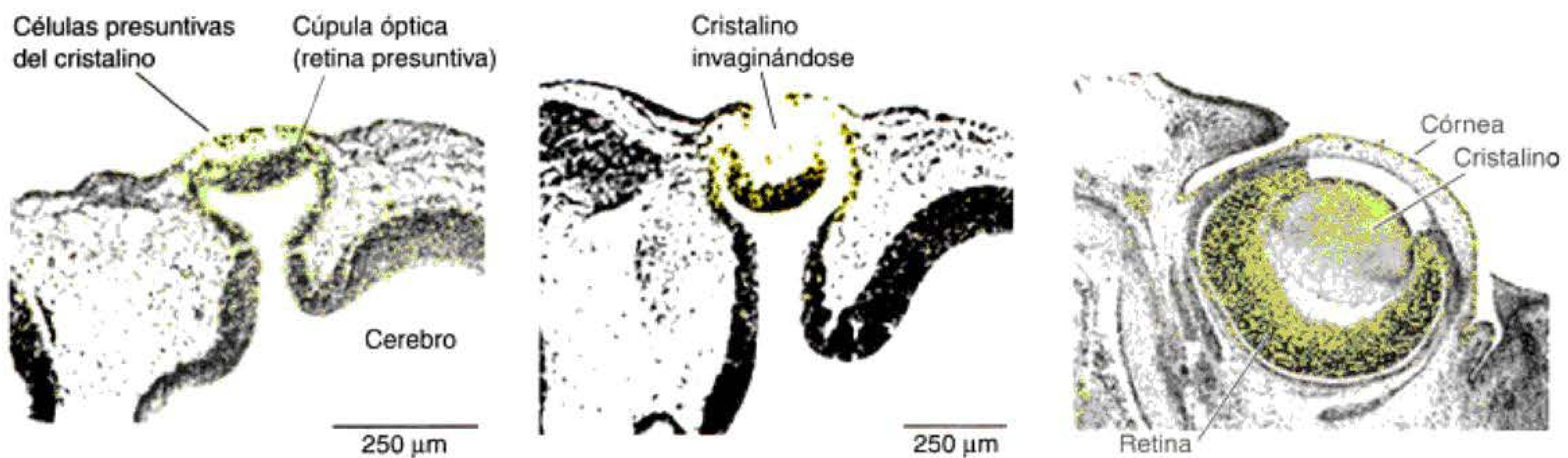


Fig. 4-17. Hibridación in situ que muestra la expresión del gen *Pax6* en el ojo del ratón en desarrollo. Las secciones microscópicas transversales fueron hechas a través de las cabezas en desarrollo de embriones de ratones de 9,10, y 15 días. En este momento, la cúpula óptica está tocando el ectodermo externo e induciendo a éste a formar el cristalino. La sonda radiactiva de DNA antisentido de *Pax6* se une solamente a donde el mRNA de *Pax6* está presente, y puede ser visualizada mediante el desarrollo de la emulsión fotográfica. Las localizaciones en donde la sonda se ha unido, representadas aquí como puntos amarillos (mediante imagen por computadora), muestran que el mensajero *Pax6* es expresado en el ectodermo presuntivo del cristalino y en el pedículo óptico, que forma la retina y el nervio óptico. (De Grindley y col. 1995; fotografía cortesía de R. E. Hill.)

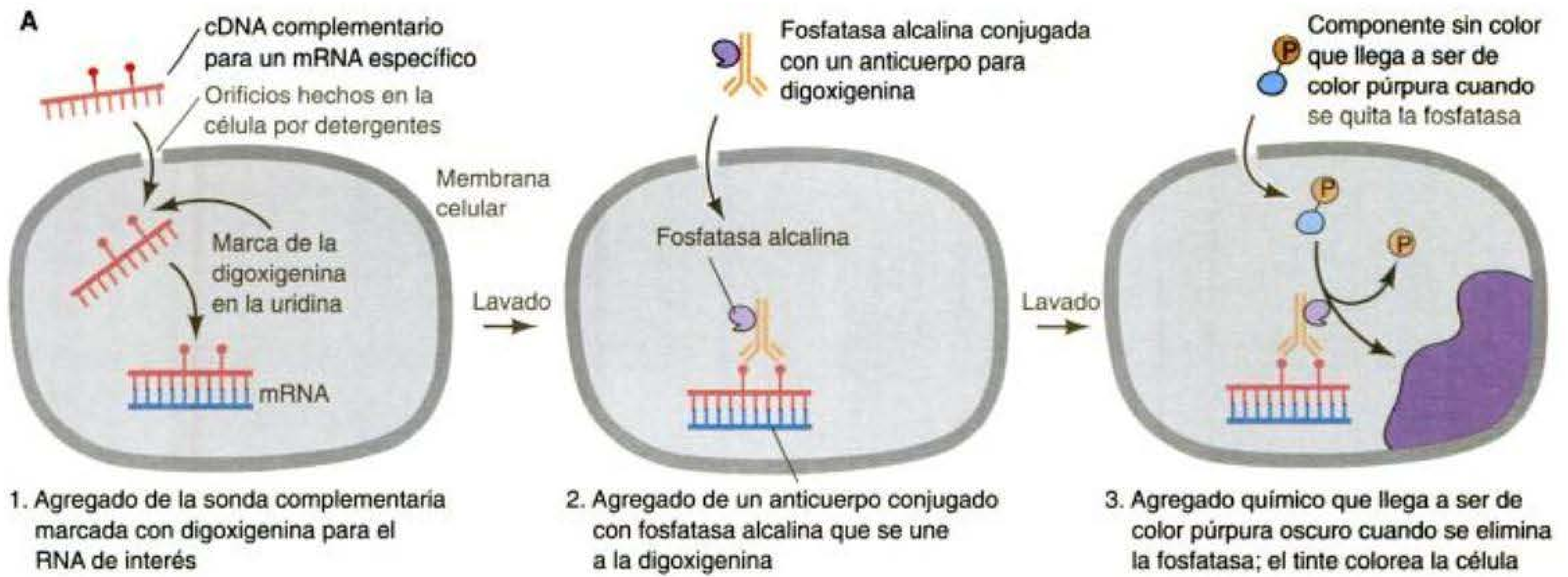
SITIO WEB 4-7 **Tecnología de micromatriz (Microarray technology).** Hay muchas variaciones sobre el esquema aquí descrito. La tecnología de micromatriz puede llegar a ser esencial para la biología del desarrollo si debemos entender los complejos cambios que se producen en la expresión de un gen cuando se diferencian los tipos celulares.

Hibridación in situ

Los análisis de Northern blot y las micromatrices pueden dar tan solo una aproximación sobre la localización espacial y la expresión temporal de un gen. Un mapa más detallado del patrón de expresión de un gen puede ser obtenido mediante un proceso denominado **hibridación in situ**. En lugar de utilizar una sonda de DNA para buscar mRNA sobre un filtro, una sonda de mRNA antisentido (que puede ser además un DNA o un RNA) es hibridada con el mRNA en el órgano mismo. El **mRNA antisentido** es producido a partir de un gen clonado en el que el gen es invertido con respecto a un promotor dentro del vector (en una sección posterior veremos cómo los genes pueden ser "invertidos"). El mRNA transcripto de ese gen codifica una secuencia complementaria a la del mRNA normal producido por este gen. Dicho mRNA antisentido puede ser utilizado como una sonda, debido a que reconocerá el mRNA "sentido" en la célula.

En una hibridación in situ, el RNA antisentido es marcado (se lo hace radiactivo o se lo une a un colorante), lo cual permite visualizar a la sonda. Por lo tanto, se produce una secuencia específica que marcará únicamente a aquellas células que han acumulado mRNA de una secuencia específica. Cuando son utilizadas las sondas radiactivas, los embriones o los órganos en primer lugar son fijados para conservar sus estructuras y para prevenir que sea degradado su mRNA. A continuación estos tejidos son seccionados para microscopia y colocados sobre un portaobjetos. Cuando se agrega la secuencia radiactiva, ésta se une solamente a donde está presente la secuencia de interés de mRNA (para la que es complementaria). Una vez que toda la sonda no unida es lavada, el portaobjetos es cubierto con una emulsión fotográfica transparente para autorradiografía. Mediante el uso de microscopio de campo oscuro (o imágenes de campo brillante mediadas por computadora), los granos de plata reducida pueden mostrarse en un color que contrasta con el fondo teñido. De este modo, se pueden visualizar las células (o incluso regiones dentro de las células) que han acumulado un tipo específico de mRNA. La figura 4-17 muestra una hibridación in situ para el mRNA de *Pax6* en ratones. Se puede ver que el mRNA de *Pax6* se localiza en la región donde la retina presuntiva se encuentra con el tejido del cristalino presuntivo. A medida que el desarrollo continúa, éste es observado en la retina en desarrollo, el cristalino y la córnea del ojo.

En hibridaciones in situ de **embriones enteros o "in toto"** (*whole-mount*), el embrión en su totalidad (o una parte de éste) puede ser teñido para algunos mRNA. Esta técnica, que utiliza colorantes en lugar de radiactividad, permite a los investigadores observar a los embriones enteros (o sus órganos) sin tener que seccionarlos, observando de este modo grandes regiones de expresión del gen. La figura 4-18 muestra una hibridación in situ realizada sobre un embrión de pollo entero que ha sido fijado sin haber sido seccionado. El embrión además tiene que haber sido permeabilizado por solventes de lípidos y proteínas de modo tal que la sonda pueda entrar y salir de sus células. La sonda utilizada en este experimento reconoce al mRNA que codifica *Pax6* en el embrión de pollo. Esta sonda no está marcada con un isótopo radiactivo, sino mediante la modificación del sustrato de nucleótido uridina trifosfato (UTP). Para crear esta sonda, una región del gen *Pax6* clonado fue transcripto a mRNA, pero con dos modificaciones importantes. En primer lugar, además de UTP regular, la mezcla de nucleótidos también contenía UTP conjugado con *digoxigenina*. La digoxigenina –un componente producido por un grupo



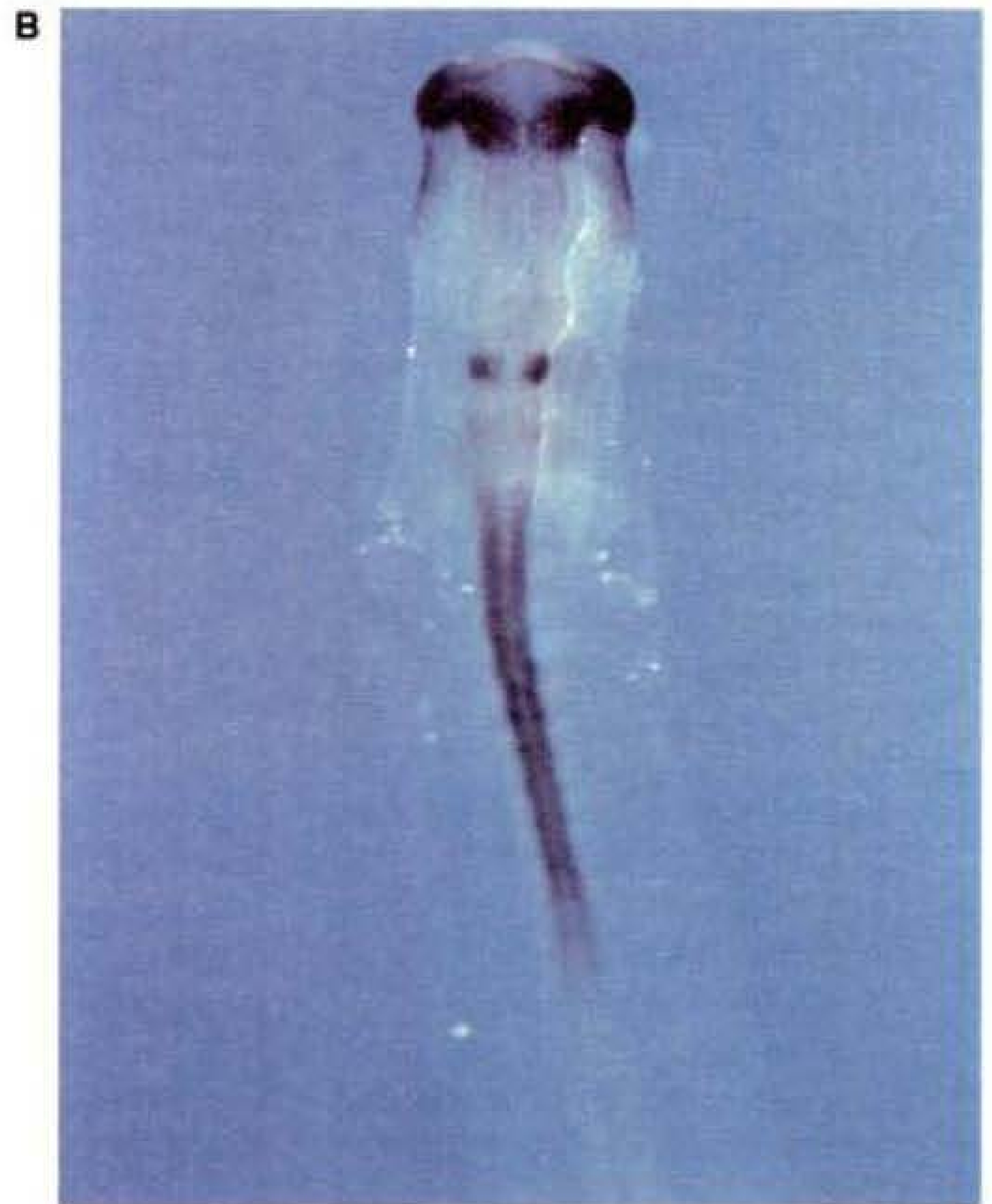


Fig. 4-18. Hibridación in situ "in toto" que localiza mRNA de *Pax6* en embriones tempranos de pollo. **A.** Esquematización del procedimiento. Una sonda antisentido marcada con digoxigenina híbrida a un mRNA específico. Anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina para digoxigenina reconocen a la sonda marcada con digoxigenina. La enzima permite convertir un componente sin color en un precipitado púrpura oscuro. **B.** El mRNA de *Pax6* puede ser visto acumularse en el techo de la región del cerebro que formará los ojos, así como en el ectodermo que formará el cristalino. También se observa la expresión más caudal de este gen en el sistema nervioso. (Según Li y col. 1994; fotografía cortesía de O. Sundin.)

particular de plantas y no encontrado en las células animales– no interfiere con las propiedades de codificación del mRNA obtenido, sino que lo hace reconociblemente diferente de cualquier otro RNA en la célula.

La sonda marcada con digoxigenina es incubada con el embrión. Después de varias horas, numerosos lavados quitan cualquier sonda que no se ha unido al embrión. Luego el embrión es incubado en una solución que contiene un anticuerpo contra digoxigenina. El único lugar en el que la digoxigenina puede existir es donde se ha unido la sonda (es decir, donde ésta reconoció su mRNA), de modo tal que el anticuerpo se pega en aquellos sitios. Este anticuerpo, sin embargo, no está en su estado natural. Éste ha sido conjugado covalentemente a una enzima, tal como la fosfatasa alcalina. Después de repetidos lavados para quitar todo el anticuerpo conjugado con la enzima que no se ha unido, el embrión es incubado en otra solución que será convertida en un colorante por acción de la enzima. La enzima estará presente únicamente donde la digoxigenina está presente, y la digoxigenina estará presente solamente donde se encuentra el mRNA complementario específico.

Así, en la figura 4-18, el precipitado azul oscuro formado por la enzima indica la presencia del mRNA de interés. La figura deja ver mRNA para la proteína de Pax6 que está presente en el techo de la región del cerebro que formará los ojos, así como en el ectodermo de la cabeza que formará el cristalino. Ésta además es expresada en una región más caudal del tubo neural como también en el páncreas.

Determinación de la función de los genes durante el desarrollo

Células y organismos transgénicos

Mientras que es importante conocer la secuencia de un gen y su patrón de expresión temporal-espacial, lo que resulta realmente importante es conocer las funciones de un gen durante el desarrollo. Técnicas desarrolladas recientemente han permitido estudiar la función del gen mediante el desplazamiento de ciertos genes dentro y fuera de las células embrionarias.

INSERCIÓN DE NUEVO DNA DENTRO DE LA CÉLULA. Porciones de DNA clonado pueden ser aisladas, modificadas (si así se desea), e insertadas dentro de las células por diferentes medios. Una técnica directa es la **microinyección**, en la que una solución que contiene el gen clonado es inyectada muy cuidadosamente dentro del núcleo de una célula (Capecchi 1980). Esta técnica es

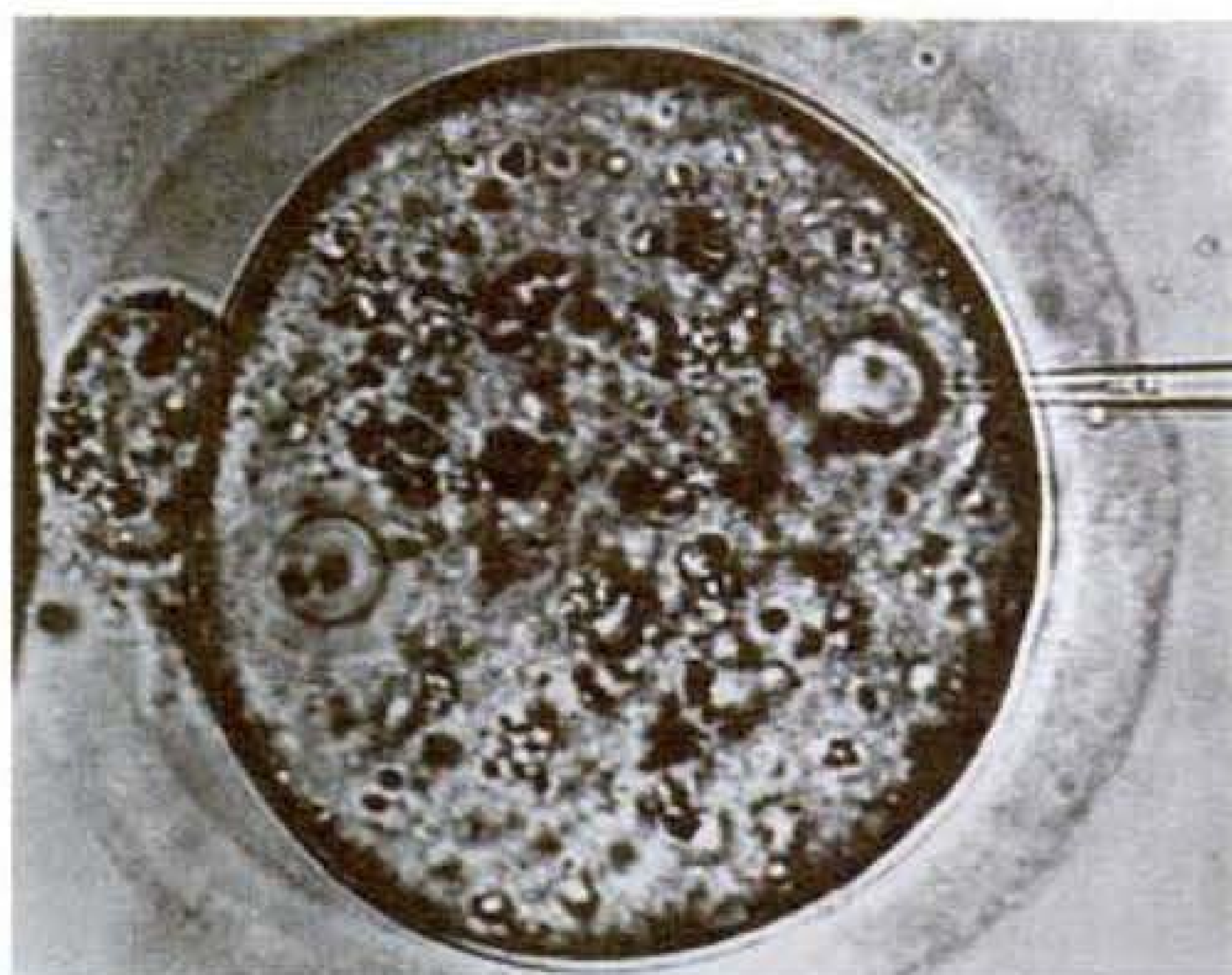


Fig. 4-19. Inserción de nuevo DNA en las células embrionarias. Aquí, el DNA (de genes clonados) es inyectado en el pronúcleo de un ovocito de ratón. (De Wagner y col. 1981; fotografía cortesía de T. E. Wagner.)

especialmente útil para inyectar genes en gametos femeninos recién fecundados (células huevo o cigotos), debido a que el núcleo haploide del espermatozoide y del ovocito son relativamente grandes (fig. 4-19). En la **transfección**, el DNA es incorporado directamente en las células al incubarlas en una solución que las hace "bebibles" en éste. Las opciones para que un fragmento de DNA sea incorporado en el cromosoma mediante este modo son relativamente pequeñas, sin embargo, debido a que el DNA de interés es mezclado generalmente con otro gen, como un gen que codifica la resistencia a un antibiótico en particular, permite a aquellas células que incorporan el DNA sobrevivir bajo condiciones de cultivo que matarán a todas las otras células (Perucho y col. 1980; Robins y col. 1981). Otra técnica similar es la **electroporación**, en la que un pulso de alto voltaje "empuja" al DNA dentro de las células.

Un camino más "natural" de llevar estos genes dentro de la célula es insertar un gen clonado en un **elemento transponible** o **vector retroviral**. Estas regiones móviles que tienen lugar naturalmente en el DNA pueden autointegrarse en el genoma de un organismo. Los retrovirus son virus con RNA. Ellos ingresan a la célula huésped, donde producen una copia de DNA de ellos mismos (utilizando su propio código viral de transcriptasa inversa); a continuación la copia se convierte en una doble cadena y se integra dentro del cromosoma huésped. La integración es llevada a cabo mediante dos secuencias idénticas (repeticiones largas del terminal) en los extremos del DNA retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser producidos mediante la eliminación de los genes de la envoltura viral (necesarios para que los virus puedan salir de la célula) a partir del centro de un retrovirus de un ratón. Esta extracción genera un sitio vacante en el cual los otros genes pueden ser colocados. Mediante el uso de enzimas de restricción apropiadas los investigadores pueden eliminar un gen de interés (como un gen aislado por PCR) e insertarlo en un vector retroviral. Estos vectores retrovirales infectan células de ratón con una eficiencia aproximada del 100%.

Del mismo modo, en *Drosophila*, se pueden transportar nuevos genes a una mosca a través de los **elementos P**. Estas secuencias de DNA están produciendo naturalmente elementos transponibles que pueden integrarse, como lo hacen los virus en cualquier región del genoma de *Drosophila*. Además, pueden ser aislados, y los genes clonados pueden ser insertados en el centro del elemento P aislado. Cuando el elemento P recombinado es inyectado en un ovocito de *Drosophila*, éste puede integrarse por sus propios medios en el DNA del embrión, proporcionando el nuevo gen al organismo (Spradling y Rubin 1982).

RATONES QUIMÉRICOS. Las técnicas descritas anteriormente han sido utilizadas para transferir genes a cada una de las células del embrión de ratón (fig. 4-20). Durante el desarrollo temprano del ratón, hay una etapa (el blastocisto) en la que solo están presentes dos tipos celulares: las células trofoblásticas externas, que formarán la porción fetal de la placenta, y la masa celular interna, cuyas células darán origen al embrión propiamente dicho. Las células internas son las células cuya separación puede llevar a la generación de gemelos (véanse caps. 3 y 11), y si una blastómera de la masa celular interna de un ratón es transferida a un embrión de un segundo ratón, esta célula donante puede contribuir a cada órgano del embrión huésped.

Las blastómeras de la masa celular interna pueden ser aisladas a partir de un embrión y cultivadas in vitro; tales cultivos celulares son denominados **células madre embrionarias (células ME)** (***embryonic stem cells-ES***). Las ME son casi totipotentes, debido a que si son inyectadas en un embrión huésped cada una de ellas puede contribuir con todos los tejidos excepto con los del trofoblasto (Gardner 1968; Moustafa y Brinster 1972). Además, una vez en cultivo, estas células pueden ser tratadas como describimos en la sección precedente de modo tal que ellas incorporarán nuevo DNA. Este gen agregado (el transgén) puede provenir de cualquier fuente eucariótica. Una célula ME tratada (la célula entera, no solo el DNA) puede luego ser inyectada en otro embrión de ratón en un estadio temprano, y como consecuencia llegará a integrarse en este huésped. El resultado es un **ratón quimérico.*** Algunas de las células quiméricas serán derivadas a partir de las células madre embrionarias del propio huésped, pero algunas porciones de sus células serán derivadas de las células madre embrionarias tratadas. Si las células tratadas llegan a ser parte de la línea germinal del ratón, algunos de sus gametos serán derivados de la célula donante. Si estos ratones quiméricos se aparean con un ratón tipo salvaje, algunas de sus progenies llevarán una copia del gen insertado. Cuando estas progenies heterocigotas se aparean entre sí, cerca del 25% de los recién nacidos resultantes llevarán dos copias del gen insertado en cada una de las células de sus cuerpos (Gossler y col. 1986). De este modo, en tres generaciones –el ratón quimérico, el ratón heterocigota, y el

* Es crítico observar la diferencia entre una quimera y un híbrido. Un **híbrido** resulta de la unión de dos genomas diferentes dentro de la misma célula: el recién nacido de un progenitor de genotipo *AA* y de un progenitor de genotipo *aa* es un híbrido *Aa*. Una **quimera** resulta cuando las células de diferente constitución genética aparecen en el mismo organismo. El término es apropiado: refiere a una mítica bestia con una cabeza de león, un cuerpo de cabra y una cola de serpiente.

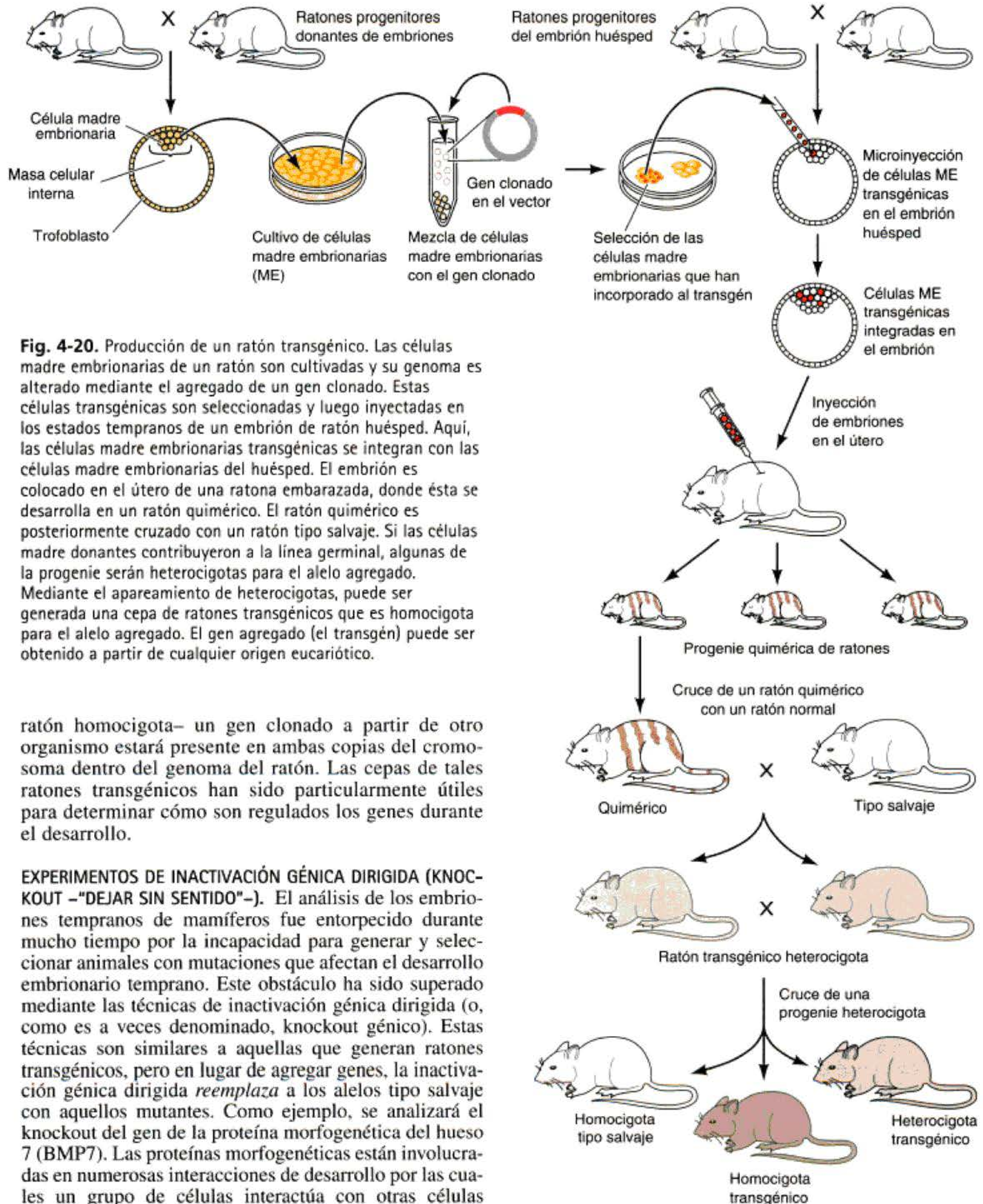


Fig. 4-20. Producción de un ratón transgénico. Las células madre embrionarias de un ratón son cultivadas y su genoma es alterado mediante el agregado de un gen clonado. Estas células transgénicas son seleccionadas y luego inyectadas en los estados tempranos de un embrión de ratón huésped. Aquí, las células madre embrionarias transgénicas se integran con las células madre embrionarias del huésped. El embrión es colocado en el útero de una ratona embarazada, donde ésta se desarrolla en un ratón quimérico. El ratón quimérico es posteriormente cruzado con un ratón tipo salvaje. Si las células madre donantes contribuyeron a la línea germinal, algunas de la progenie serán heterocigotas para el alelo agregado. Mediante el apareamiento de heterocigotas, puede ser generada una cepa de ratones transgénicos que es homocigota para el alelo agregado. El gen agregado (el transgén) puede ser obtenido a partir de cualquier origen eucariótico.

ratón homocigota– un gen clonado a partir de otro organismo estará presente en ambas copias del cromosoma dentro del genoma del ratón. Las cepas de tales ratones transgénicos han sido particularmente útiles para determinar cómo son regulados los genes durante el desarrollo.

EXPERIMENTOS DE INACTIVACIÓN GÉNICA DIRIGIDA (KNOCKOUT –"DEJAR SIN SENTIDO"–). El análisis de los embriones tempranos de mamíferos fue entorpecido durante mucho tiempo por la incapacidad para generar y seleccionar animales con mutaciones que afectan el desarrollo embrionario temprano. Este obstáculo ha sido superado mediante las técnicas de inactivación génica dirigida (o, como es a veces denominado, knockout génico). Estas técnicas son similares a aquellas que generan ratones transgénicos, pero en lugar de agregar genes, la inactivación génica dirigida *reemplaza* a los alelos tipo salvaje con aquellos mutantes. Como ejemplo, se analizará el knockout del gen de la proteína morfogenética del hueso 7 (BMP7). Las proteínas morfogenéticas están involucradas en numerosas interacciones de desarrollo por las cuales un grupo de células interactúa con otras células vecinas para alterar sus propiedades. BMP7 ha sido implicada como una proteína que previene la muerte celular y promueve la división celular en varios órganos en desarrollo.

Dudley y col. (1995) utilizaron la inactivación génica dirigida para encontrar la función de *Bmp7* en el desarrollo del ratón. En primer lugar, aislaron el gen de *Bmp7*, lo cortaron en un sitio con una enzima de restricción, e insertaron en este sitio un gen bacteriano para resistencia a neomicina (fig. 4-21). En otras palabras, mutaron al gen *Bmp7* mediante la inserción de un gran trozo de DNA extraño, destruyendo la capacidad de la

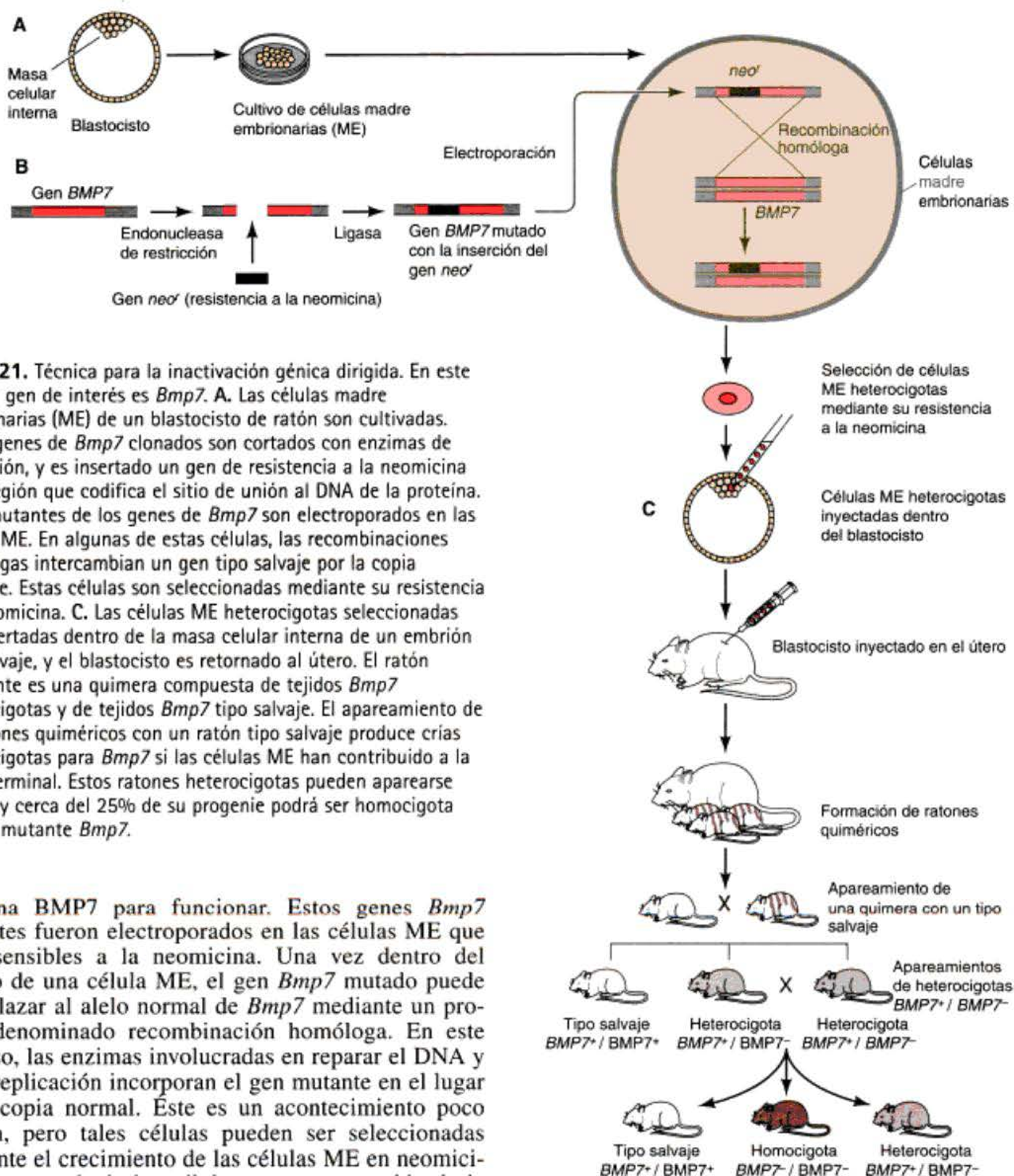


Fig. 4-21. Técnica para la inactivación génica dirigida. En este caso, el gen de interés es *Bmp7*. **A.** Las células madre embrionarias (ME) de un blastocisto de ratón son cultivadas. **B.** Los genes de *Bmp7* clonados son cortados con enzimas de restricción, y es insertado un gen de resistencia a la neomicina en la región que codifica el sitio de unión al DNA de la proteína. Estos mutantes de los genes de *Bmp7* son electroporados en las células ME. En algunas de estas células, las recombinaciones homólogas intercambian un gen tipo salvaje por la copia mutante. Estas células son seleccionadas mediante su resistencia a la neomicina. **C.** Las células ME heterocigotas seleccionadas son insertadas dentro de la masa celular interna de un embrión tipo salvaje, y el blastocisto es retornado al útero. El ratón resultante es una quimera compuesta de tejidos *Bmp7* heterocigotas y de tejidos *Bmp7* tipo salvaje. El apareamiento de los ratones quiméricos con un ratón tipo salvaje produce crías heterocigotas para *Bmp7* si las células ME han contribuido a la línea germinal. Estos ratones heterocigotas pueden aparearse juntos, y cerca del 25% de su progenie podrá ser homocigota para el mutante *Bmp7*.

proteína BMP7 para funcionar. Estos genes *Bmp7* mutantes fueron electroporados en las células ME que eran sensibles a la neomicina. Una vez dentro del núcleo de una célula ME, el gen *Bmp7* mutado puede reemplazar al alelo normal de *Bmp7* mediante un proceso denominado recombinación homóloga. En este proceso, las enzimas involucradas en reparar el DNA y en la replicación incorporan el gen mutante en el lugar de la copia normal. Éste es un acontecimiento poco común, pero tales células pueden ser seleccionadas mediante el crecimiento de las células ME en neomicina. La mayoría de las células muere por acción de la droga, pero aquellas que han adquirido la resistencia a partir del gen incorporado sobreviven. Las células obtenidas tienen un gen *Bmp7* normal y un gen *Bmp7* mutado. Estas células ME heterocigotas fueron luego microinyectadas en blastocistos de ratón, en donde se integraron a las células del embrión. Los ratones obtenidos fueron quimeras compuestas de células tipo salvaje a partir del embrión huésped y de células con *Bmp7* heterocigota a partir de las células ME donantes. Las quimeras fueron apareadas con ratones tipo salvaje, produciendo progenies que eran heterocigotas para el gen *Bmp7*. Estos ratones heterocigotas fueron luego apareados entre sí, y cerca del 25% de su progenie llevaba dos copias del gen *BMP7* mutado. Estos ratones mutantes homocigotas carecían de ojos y de riñones (fig. 4-22). Ante la ausencia de BMP7, muchas de las células que normalmente forman estos dos órganos detienen su división y mueren. En este sentido, la inactivación génica dirigida puede ser utilizada para analizar el rol de genes específicos durante el desarrollo de los mamíferos.

SITIO WEB 4-8 **Knockout de genes específicos en tiempos y lugares específicos (Knocking out specific genes at specific times and places).** Algunos genes son activos temprano en el desarrollo y también más tarde en el desarrollo. Si sus funciones tempranas son críticas para la vida del embrión, no se podrá saber que la función tardía es por el knockout del gen. Las técnicas han sido desarrolladas para el knockout de un gen solamente en tipos celulares particulares.

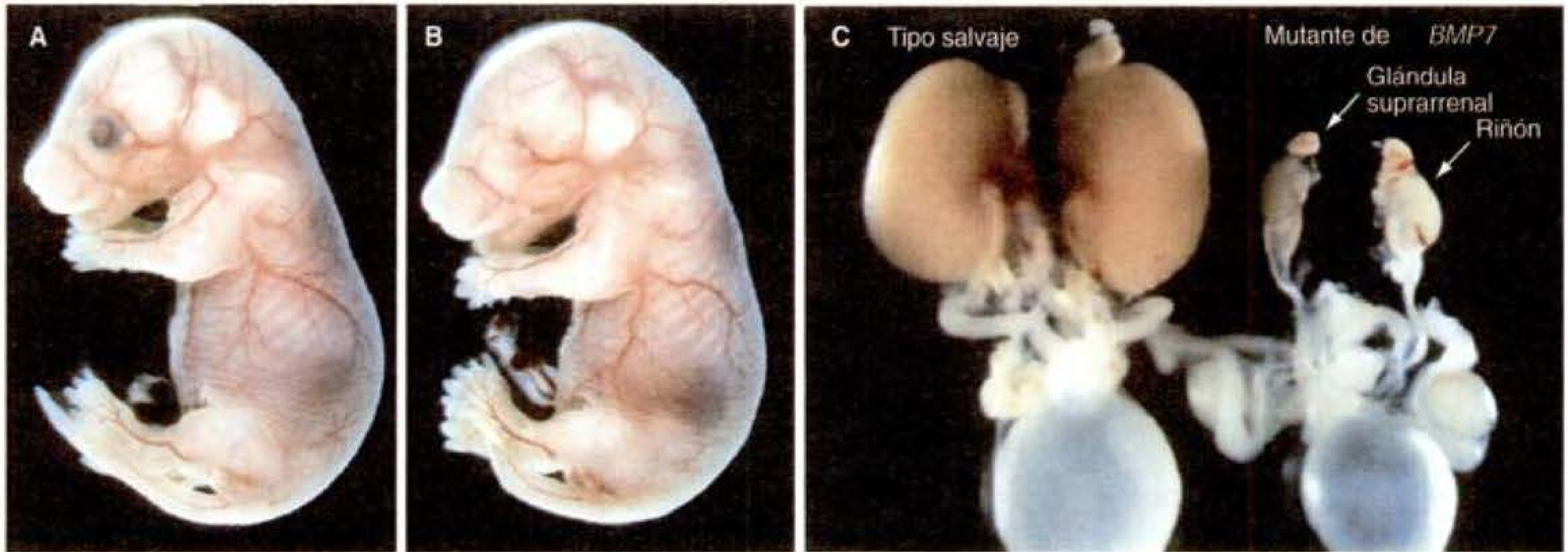
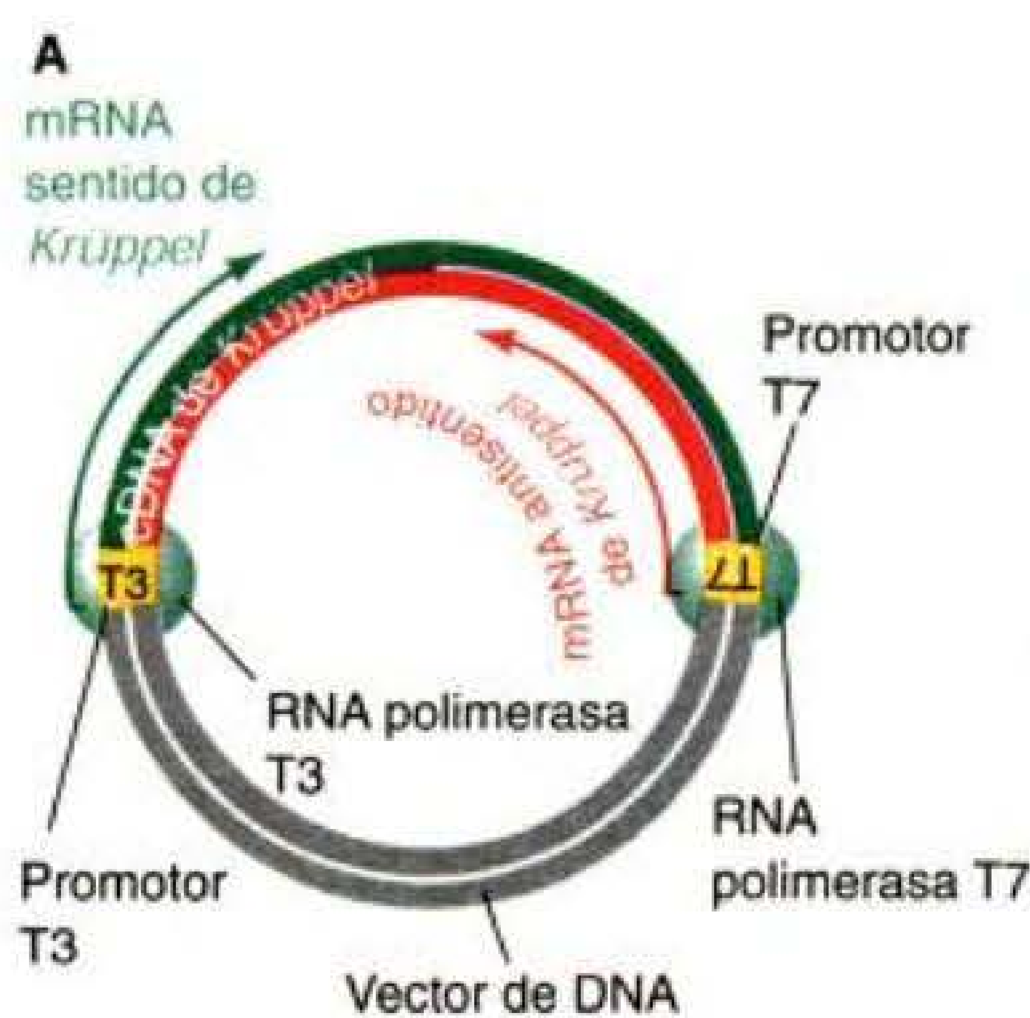


Fig. 4-22. Análisis morfológico de ratones knockout para *Bmp7*. **A.** Tipo salvaje y **B** ratón homocigota deficiente de *Bmp7* a los 17 días de los 21 días que dura la gestación. Los ratones deficientes de *Bmp7* carecen de ojos. **C.** Los riñones de estos ratones a los 19 días de gestación. El riñón de un ratón deficiente de *Bmp7* (derecha) está severamente atrofiado. Las secciones microscópicas revelan la muerte de las células que de otro modo habrían formado las nefronas. (De Dudley y col. 1995; fotografía cortesía de E. Robertson.)

Determinación de la función de un mensajero: RNA antisentido

Otro método para la determinación de la función de un gen durante el desarrollo es mediante el empleo de copias "antisentido" de su mensajero para bloquear la función de este mensaje. Los RNA antisentido permiten a los biólogos del desarrollo analizar la acción de los genes que de otro modo podrían ser inaccesibles para el análisis genético.

Los mensajes antisentido pueden ser generados mediante la inserción de DNA clonado en vectores que tienen promotores en ambos extremos de un gen insertado. Cuando el vector es incubado con nucleótidos trifosfato (como UTP) y una RNA polimerasa específica, uno de los promotores comenzará la transcripción del mensaje "en la dirección incorrecta". Haciéndolo así, éste sintetiza un transcripto que es complementario del natural (fig. 4-23A). Este transcripto complementario es denominado RNA antisentido debido a que es complementario del mensaje original ("con sentido"). Cuando una gran cantidad de RNA antisentido se inyecta o transfecta en las células con el mRNA normal a partir del mismo gen, el RNA antisentido se une al mensajero normal, y la doble cadena de ácidos nucleicos obtenida es degradada por enzimas en el citoplasma



B Embrión mutante de *Krüppel*



Embrión tipo salvaje



Embrión tipo salvaje inyectado con RNA "antisentido" de *Krüppel*



Fig. 4-23. Uso de RNA antisentido para examinar los roles de los genes en el desarrollo. **A.** Un mensajero antisentido (en este caso, el del gen *Krüppel* de *Drosophila*) es producido colocando un fragmento de cDNA clonado codificando el mensajero de *Krüppel* entre dos promotores fuertes (donde la RNA polimerasa se une para dar comienzo a la transcripción). Estos dos promotores están en orientación opuesta con respecto al cDNA de *Krüppel*. En este caso, el promotor T3 está en una orientación normal y el promotor T7 está invertido. Estos promotores son reconocidos por RNA polimerasas diferentes (a partir de los bacteriófagos T3 y T7, respectivamente). La T3 polimerasa permite la transcripción del mRNA "sentido", mientras que la T7 polimerasa transcribe el transcripto antisentido. **B.** Resultado de la inyección del mensajero antisentido de *Krüppel* dentro de un embrión temprano (estadio de blastodermo sincitial) de *Drosophila* antes de que sea producido el mensajero *Krüppel* normal. La figura central es un embrión tipo salvaje justo previo a nacer. El de arriba es un mutante que carece del gen *Krüppel*. El de abajo es un embrión tipo salvaje que fue inyectado con el mensajero antisentido *Krüppel* en el estadio de blastodermo sincitial. El mutante y el embrión tratado con antisentido carecen de los segmentos torácicos y abdominales anteriores. (**B**, según Rosenberg y col. 1985.)

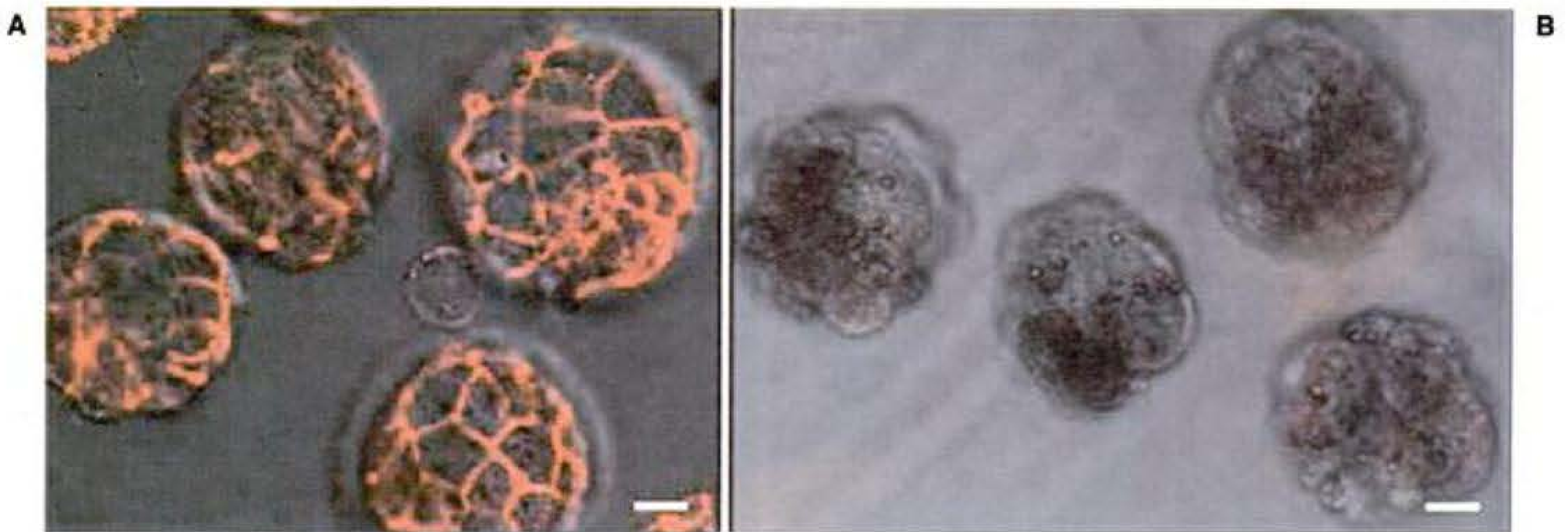


Fig. 4-24. La inyección de dsRNA para cadherina-E en un cigoto de ratón bloquea la expresión de cadherina-E. **A.** Tinción de cadherina-E en embriones de ratón de 4-días. Estos embriones fueron inyectados con un dsRNA control que no reconoce mensajero alguno en el embrión de ratón. La tinción fue hecha mediante un anticuerpo fluorescente (rojo) que se une a la cadherina-E. **B.** Embriones de ratón de 4-días inyectados en el estadio de cigoto con dsRNA de cadherina E. Casi no puede reconocerse cadherina E mediante la tinción de anticuerpos, y los embriones están malformados debido a que carecen de esta proteína de adhesión celular. El mismo tipo de embriones anormales puede ser producido mediante el knockout del gen de cadherina-E. Barras de escala de 20 mm. (De Wianny y Zernicka-Goetz 2000.)

celular, provocando una supresión funcional del mensaje –como si hubiese una supresión por mutación para este gen.

Las similitudes entre los fenotipos producidos por una mutación de pérdida de función y por el tratamiento con RNA antisentido fueron demostradas mediante la elaboración de un RNA antisentido para el gen *Krüppel* de *Drosophila*. *Krüppel* es crítico para formar el tórax y el abdomen de la mosca. Si este gen está ausente, las larvas de mosca mueren debido a que carecen de segmentos torácicos y abdominales anteriores (fig. 4-23B). Un defecto similar puede crearse mediante la inyección de grandes cantidades de RNA antisentido contra el mensajero *Krüppel* en los embriones tempranos de mosca (Rosenberg y col. 1985).

OLIGÓMEROS ANTISENTIDO DE MORFOLINO. Una modificación importante de la tecnología antisentido es la utilización de **oligómeros antisentido de morfolino** (Summerton y Weller 1997). Estas moléculas difieren de los oligonucleótidos antisentido tradicionales en que contienen seis miembros de anillos de morfolino en lugar de cinco miembros de azúcares de ribosa o de desoxirribosa. Esta estructura les da una resistencia completa a las nucleasas, permitiéndoles permanecer intactas y funcionar durante mucho tiempo. Además, pueden hibridarse con sus mRNA de interés independientemente de la concentración de sal y en un gran rango de concentración. Su estabilidad les permite iniciar eventos durante muchas generaciones celulares luego de que fueron inyectados por primera vez dentro de la célula. (Heasman y col. 2000). Los oligómeros de morfolino antisentido funcionan mediante la inhibición del comienzo de la traducción, y están de este modo hechos contra secuencias muy próximas a los sitios de inicio de la traducción del mensaje.

INTERFERENCIA DEL RNA. Otro tipo secuencia-específica dirigida inactivadora de mRNA que lleva a la inhibición de su expresión es el **RNA de interferencia (RNAi)**. Aquí, la introducción de RNA de doble cadena homólogo (dsRNA) produce un fenotipo que parece ser el mismo que aquellos esperados si el mRNA ha sido degradado o está ausente. En lugar de inhibir la traducción, RNAi funciona mediante la degradación del mensajero de interés. Los biólogos han utilizado RNAi para estudiar el desarrollo en nematodos, *Droshophila*, plantas, hongos y ratones.

La primera evidencia de que dsRNA puede llevar a silenciar un gen proveniente de un trabajo sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Guo y Kemphues (1995) intentaban utilizar RNA antisentido para apagar la expresión del gen *par-1* con el objetivo de evaluar su función, y uno de sus controles no funcionó. O en su lugar, funcionó demasiado bien. Como esperaban, la inyección de RNA antisentido interrumpió la expresión del gen *par-1*. Por lo tanto, entonces hicieron la inyección de la cadena control-sentido. El misterio fue resuelto por Fire y col. (1998), que inyectaron dsRNA en *C. elegans*. La inyección de dsRNA resultó en un silenciamiento mucho más eficiente de la expresión del gen que la inyección de la cadena sentido o antisentido únicamente. En efecto, solo unas pocas moléculas de dsRNA por célula fueron suficientes para silenciar completamente la expresión del gen de interés. Además, la inyección de dsRNA en el intestino del gusano no solo silenció la expresión del gen, sino que también detuvo su expresión en la siguiente generación. Este resultado resultó ser un fenómeno general.

Los dsRNA aparentemente funcionan mediante la activación de una enzima ("Cortadora" –Dicer-) que los rompe en pequeños trozos. Estas pequeñas piezas luego se unen a otro complejo de enzimas que destruyen cualquier RNA unidos por aquellos pequeños fragmentos (fig. 4-24; Hunter 2000; Hammond 2001). Estas enzimas probablemente evolucionaron como un camino para prevenir las infecciones virales, debido a que los virus a menudo tienen RNA intermediarios de doble cadena, y esta técnica ha probado ser aplicable en muchos organismos.

Cierre

En la década de 1990, nuevas técnicas han permitido aislar genes individuales, para localizar mRNA de genes específicos, y para suprimir o silenciar la expresión de genes específicos. Esta tecnología permitió a los biólogos responder preguntas que eran incontestables sólo unos pocos años atrás. Por primera vez en la historia humana, nos enfrentamos con la capacidad para entender cómo los potenciales heredados del núcleo llegan a ser expresados en la formación de nuestros órganos.

Principios de desarrollo: aproximación genética del desarrollo

1. El desarrollo relaciona genotipo y fenotipo.

2. Un genotipo dado puede producir un limitado rango de fenotipos, dependiendo de los procesos azarosos y de las interacciones ambientales con el organismo en desarrollo.

3. La capacidad de los núcleos de las células diferenciadas para dirigir el desarrollo de un organismo adulto completo ha confirmado recientemente el principio de equivalencia genómica.

4. Los genes nucleares no son perdidos o mutados durante el desarrollo. El genoma de cada célula es equivalente al de cada uno de los otros tipos celulares.

5. Las excepciones a la regla de la equivalencia genómica son los linfocitos. Durante la diferenciación, estas células reorganizan su DNA para crear nuevos genes de inmunoglobulinas y de receptor de antígeno.

6. Solo un pequeño porcentaje del genoma es expresado en una célula específica.

7. Los cromosomas politénicos, en los que el DNA se ha replicado sin separarse (como en las glándulas salivales de las larvas de *Drosophila*), muestran regiones en donde el DNA comienza a transcribirse. Diferentes tipos celulares muestran diferentes regiones de DNA siendo transcriptas.

8. Las técnicas de Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa e hibridación in situ pueden mostrar que células están transcribiendo genes específicos.

9. Las micromatrices y las macromatrices permiten comparar simultáneamente miles de genes en diferentes tipos de células.

10. Las funciones de un gen a menudo pueden ser determinadas mediante técnicas que manipulan la expresión de los genes. Estas técnicas incluyen métodos para inhibir la expresión de genes como los RNA antisentido; métodos para eliminar un gen, como los knockouts en ratones y el uso de transgenes para sobreexpresar o expresar ectópicamente un gen.

11. Los RNA de doble cadena pueden suprimir específicamente mensajeros de un gen en particular.

Bibliografía citada

Agrawal, A., Q. M. Eastman and D. G. Schatz. 1998. Transposition mediated by RAGI and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. Nature 394: 744-751.

Allen, G. E.1986. T. H. Morgan and the split between embryology and genetics, 1910-1935. In T. J. Horder, J. A. Witkowski and C. C. Wylie (eds.), A History of Embryology. Cambridge University Press, New York, pp. 113-146.

Altmann, C. R., E. Bell, A. Sczyrba, J. Pun, S. Bekiranov, T. Gaasterland and A. H. Brivanlou. 2001. Microarray-based analysis of early development in Xenopus laevis. Dev. Biol. 236: 64-75.

Ashworth, D. and 10 others. 1998. DNA satellite analysis of Dolly. Nature 394: 329.

Baltzer, F. 1967. Theodor Boveri: Life and Work of a Great Biologist. (Trans. D. Rudnick.) University of California Press, Berkeley.

Barnett, T., C. Pachl, J. P. Gergen and P. C. Wensink. 1980. The isolation and characterization of Drosophila yolk protein genes. Cell 21: 729-738.

Bassing, C. H., W. Swat and F. W. Alt. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. Cell 109: S45-S55.

Beermann, W. 1952. Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma 5: 139-198.

Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc Natl. Acad Sci. USA 38: 455-464.

Brush, S. 1978. Nettie Stevens and the discovery of sex determination. Isis 69: 132-172.

Burian, R., J. Gayon and D. T. Zallen. 1991. Boris Ephrussi and the synthesis of genetics and embryology. In S. Gilbert (ed.), A Conceptual History of Modern Embryoloy. Plenum, New York, pp. 207-227.

Burkholder, G. D. 1976. Whole mount electron microscopy of polytene chromosome from Drosophila melanogaster. Can. J. Genet. Cytol. 18: 67-77.

Capecchi, M. R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 22: 479-488.

Chun, J. J. M., D. G. Schatz, M. A. Oettinger, R. Jaenisch and D. Baltimore. 1991. The recombination activating gene I (RAG-I) is present in

the murine central nervous system. Cell 64: 189-200.

Dudley, A. T., K. M. Lyons and E. J. Robertson. 1995. A requirement for bone morphogenetic protein 7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev. 9: 2795-2807.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811.

Fujimoto, S. and H. Yamagishi. 1987. Isolation of an excision product of T cell receptor α-chain gene rearrangements. Nature 327: 242-244.

Gardner, R. L. 1968. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. Nature 220: 596-597.

Gilbert, S. F. 1978. The embryological origins of the gene theory. J. Hist. Biol. 11: 307-351.

Gilbert, S. F. 1987. In friendly disagreement: Wilson, Morgan, and the embryological origins of the gene theory. Am. Zool. 27: 797-806.

Gilbert, S. F. 1988. Cellular politics: Ernest Everett Just, Richard B. Goldschmidt, and the attempts to reconcile embryology and genetics. In R. Rainger, K. R. Benson and J. Maienschein (eds.), The American Development of Biology. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, pp. 311-346.

Gilbert, S. F. 1991. Induction and the origins of developmental genetics. In S. F. Gilbert (ed.), A Conceptual History of Modern Embryology. Plenum, New York, pp. 181-206.

Gilbert, S. F. 1996. Enzyme adaptation and the entrance of molecular biology into embryology. In S. Sarkar (ed.), The Molecular Philosophy and History of Molecular Biology: New Perspectives. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 101-124.

Gluecksohn-Schoenheimer, S. 1938. The development of two tailless mutants in the house mouse. Genetics 23: 573-584.

Gluecksohn-Schoenheimer, S. 1940. The effect of an early lethal (t^o) in the house mouse. Genetics 25: 391-400.

Gossler, A., T. Doetschman, R. Korn, E. Serfling and R. Kemler. 1986. Transgenesis by means of blastocyst-derived stem cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065-9069.

Grindley, J. C., D. R., Davidson and R. E. Hill. 1995. The role of Pax-6 in eye and nasal development. Development 121: 1433-1442.

Guo, S. and K. J. Kemphues. 1995. Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 81: 611-620.

Gurdon, J. B., R. A. Laskey and O. R. Reeves. 1975. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morphol. 34: 93-112.

Hammond, S. M., A. A. Caudy and G. J. Hannon. 2001. Posttranscriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Rev. Gen. 2: 110-119.

Harrison, R. G. 1937. Embryology and its relations. Science 85: 369-374.

Harwood, J. 1993. Styles of Scientific Thought. The German Genetics Community 1900 1934. University of Chicago Press, Chicago.

Heasman, J., M. Kofron and C. Wylie. 2000. β-Catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: A novel antisense approach. Dev. Biol. 222: 124-134.

Houmi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin gnes coding for variable and constant regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3628-3632.

Humphreys, D. and 7 others. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. Science 293: 95-97.

Hunter, C. P. 2000. Shrinking the black box of RNAi. Curr. Biol. 10: R137-R140.

Jaenisch, R. and I. Wilmut. 2001. Don't clone humans! Science 291: 2662.

Iust, E. E. 1939. The Biology of the Cell Surface. Blakiston, Philadelphia.

Kato, Y. and 7 others. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282: 2095-2098.

Keller, E. F. 1995. Kefiguring Life: Metaphors of Twentieth-Century Biology. Columbia University Press, New York.

King, T. J. 1966. Nuclear transplantation in amphibia. Methods Cell Physiol. 2: 1-36.

King, T. J. and R. Briggs. 1956. Serial transplantation of embryonic nuclei. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 21: 271-289.

Kolata, G. 2001. Researchers find big risk of defect in cloning animals. New York Times, 25 March.

Li, H.-S., J.-M. Yang, R. D. Jacobson, D. Pasko and O. Sundin. 1994. Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: Implications for stepwise determination of the lens. Dev. Biol. 162: 181-194.

Lillie, F. R. 1927. The gene and the ontogenetic process. Science 64: 361-368.

Matsuoka, M. and 8 others. 1991. Detection of somatic DNA recombination in the transgenic mouse brain. Science 254: 81-86.

McKinnell, R. G. 1978. Cloning-Nuclear Transplantation in Amphibia. University of Minnesota Press, Minneapolis.

Meade, H. M. 1997. Dairy gene. The Sciences (Sept./Oct.), 20-25.

Mendel, G. 1866. Versuche über Pflanzenhybriden, Verh. Naturf. Vereines (Brünn) 4:3-47.

Morange, M. 1996. Construction of the developmental gene concept. The crucial years: 1960-1980. Biol. Zent. bl. 115:132-138.

Morgan, T.H. 1926. The Theory of the Gene. Yale University Press, New Haven.

Moustafa, L. A. and R. L. Brinster. 1972. Induced chimaerism by transplanting embryonic cells into mouse blastocysts. J Exp. Zool. 181:193-202.

Oppenheimer, J. M. 1981. Walter Landauer and developmental genetics. In S. Subtelny and U. K. Abbott (eds.), Levels of Genetic Control in Development. Alan R. Liss, New York, pp. 1-14.

Perucho, M., D. Hanahan and M. Wigler, 1980. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. Cell 22:309-317.

Prather, R. S. 1991. Nuclear transplantation and embryo cloning in mammals. Int. Lab. Anim. Res. News 33: 62-68.

Rappolee, D. A., C. A. Brenner, R. Schultz, D. Mark and Z. Werb. 1988. Developmental expression of PDGF, TGF-α and TGF-β genes in preimplantation mouse embryos. Science 241: 1823-1825.

Robins, D. M., S. Ripley, A. S. Henderson and R. Axel. 1981. Transforming DNA integrates into the host chromosome. Cell 23: 29-39.

Rosenberg, U. B., A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle and D. C. Knipple. 1985. Production of phenocopies by Krüppel antisense RNA injection into Drosophila embryos. Nature 313: 703-706.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Sander, K. 1986. The role of genes in ontogenesis: Evolving concepts from 1883 to 1983 as perceived by an insect embryologist. In T. J. Horder, J. A. Witkowski and C. C. Wylie (eds.), A History of Embryology. Cambridge University Press, New York, pp. 363-395.

Schnieke, A. and 8 others. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science 278: 2130-2134.

Schwarz, K. and 11 others. 1996. Rag mutations in human B cell-negative SCID. Science 274: 97-99.

Shin T, and 9 others. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. Nature 415: 859.

Signer, E. N., Y. E. Dubrova, A. J. Jeffreys, C. Wilde, L. M. B. Finch, M. Wells and M. Peaker. 1998. DNA fingerprinting Dolly. Nature 394: 329-330.

Smith, L. D. 1956. Transplantation of the nuclei of primordial germ cells into enucleated eggs of Rana pipiens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 101-107.

Spemann, H. 1938. Embryonic Development and Induction. Yale University Press. New Haven.

Spradling, A. C. and G. M. Rubin. 1982. Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. Science 218: 41-47.

Stevens, N. M. 1905a. Studies in Spermatogenesis with Especial Reference to the "Accessory Chromosome." Carnegie Institute of Washington, Washington, D.C.

Stevens, N. M. 1905b. A study of the germ cells of Aphis rosae and Aphis oenotherae. J. Exp. Zool. 2:371-405, 507-545.

Summerton, J. and D. Weller. 1997. Morpholino antisense oligomers: Design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 187-195.

Ton, C. C. and 120 others. 1991. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. Cell 67: 1059-1074.

Villa, A. and 11 others. 1998. Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. Cell 93: 885-896.

Waddington, C. H. 1939. Preliminary notes on the development of wings in normal and mutant strains of Drosophila. Proc. Nad. Acad. Sci. USA 25: 299-307.

Waddington, C. H. 1948. The Scientific Attitude. Pelican Books, New York.

Wagner, T. E., P. Hoppe, J. D. Jollick, D. R. Scholl, R. L. Hodinka and J. B. Gault. 1981. Microinjection of rabbit β-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and offspring. Proc. Natl Acad. Sci USA 78: 6376-6380.

Wan, J. S. and 11 others. 1996. Cloning differentially expressed mRNAs. Nature Biotech. 14: 1685-1691.

Wakayama, T., A. C. F. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394: 369-374.

Wetmur, J. G. and N. Davidson. 1968. Kinetics of renaturation of DNA. J. Mol. Biol. 31: 349-370.

White, K. P., S. A. Rifkin, P. Hurban and D. S. Hogness. 1999. Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis. Science 286: 2179-2184.

Wianny, F. and M. Zernicka-Goetz. 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nature Cell Biol. 2: 70-75.

Wilkinson, D. G., S. Bhatt and B. G. Herrmann. 1990. Expression pattern of the mouse T gene, and its role in mesoderm formation. Nature 343: 657-659.

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810-814.

Wilmut, I., K. Campbell and C. Tudge. 2000. The Second Creation: Dolly and the Age of Biological Control. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wilson, E. B. 1895. An Atlas of the Fertilization and Karyogenesis of the Ovum. Macmillan, New York.

Wilson, E. B. 1896. The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson, E. B. 1905. The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. Science 22: 500-502.

Capítulo 5 El paradigma de la expresión génica diferencial

Pero lo que las operaciones inmediatas de los genes resultan ser, pertenecen lo más ciertamente posible a la categoría de procesos de desarrollo y pertenecen así a la providencia de la embriología. Este problema central de la biología fundamental en este momento está siendo atacado actualmente de muchos lados, por los fisiólogos y los bioquímicos y por los genetistas; pero es esencialmente un problema embriológico.

C. H. WADDINGTON (1956)

Nosotros hemos entrado a la célula, la mansión de nuestro nacimiento, y hemos comenzado el inventario de nuestra riqueza adquirida.

ALBERT CLAUDE (1974)

DIFERENTES TIPOS CELULARES tienen diferentes grupos de proteínas, aunque sus genomas son idénticos. Cada ser humano tiene aproximadamente 50.000 genes en cada núcleo, pero cada una de las células utiliza solamente un pequeño subgrupo de estos genes. Además, los diferentes tipos celulares utilizan diferentes subgrupos de genes. Los glóbulos rojos sanguíneos producen la proteína globina, las células del cristalino producen cristalina, los melanocitos producen melanina y las glándulas endocrinas producen sus hormonas específicas. La **genética del desarrollo** es una disciplina que estudia cómo el genotipo es transformado en fenotipo, y el mayor paradigma de la genética del desarrollo es la *expresión génica diferencial a partir del mismo repertorio nuclear*. En este capítulo se discutirán los mecanismos de la diferenciación celular: cómo varios genes presentes en el núcleo son activados o reprimidos en tiempos y lugares específicos para hacer que las células lleguen a ser diferentes una de la otra.

La expresión del gen puede ser regulada en varios niveles:

- **La transcripción génica diferencial** regula cuál de los genes nucleares son transcriptos en RNA.
- **El procesamiento nuclear selectivo de RNA** regula cuáles de los RNAs transcriptos (o qué partes de estos RNA nucleares) entran al citoplasma para convertirse en RNA mensajeros.
- **La traducción selectiva de RNA mensajero** regula cuáles de los mRNA del citoplasma llega a ser traducido en proteína.
- **La modificación diferencial de proteínas** regula a cuáles proteínas se les permite permancer o funcionar en la célula.

Algunos genes (como los que codifican para las proteínas de la globina de la hemoglobina) están regulados en cada uno de estos niveles.

Transcripción génica diferencial

Anatomía del gen: exones e intrones

Dos diferencias fundamentales distinguen a la mayoría de los genes de eucariota de la mayoría de los genes de procariota. En primer lugar, los genes eucarióticos están contenidos dentro de un complejo de DNA y proteína denominado **cromatina.** La proteína componente constituye cerca de la mitad del peso de la cromatina y está compuesta principalmente de **histonas.** El **nucleosoma** constituye la unidad básica de la estructura de la cromatina y está formado por un octámero de proteínas de histona (dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) envueltas con dos asas de cromatina con aproximadamente 140 pares de bases de DNA (Kornberg y Thomas 1974). La cromatina puede visualizarse como una cuerda de cuentas de nucleosoma unidas por cintas de DNA.

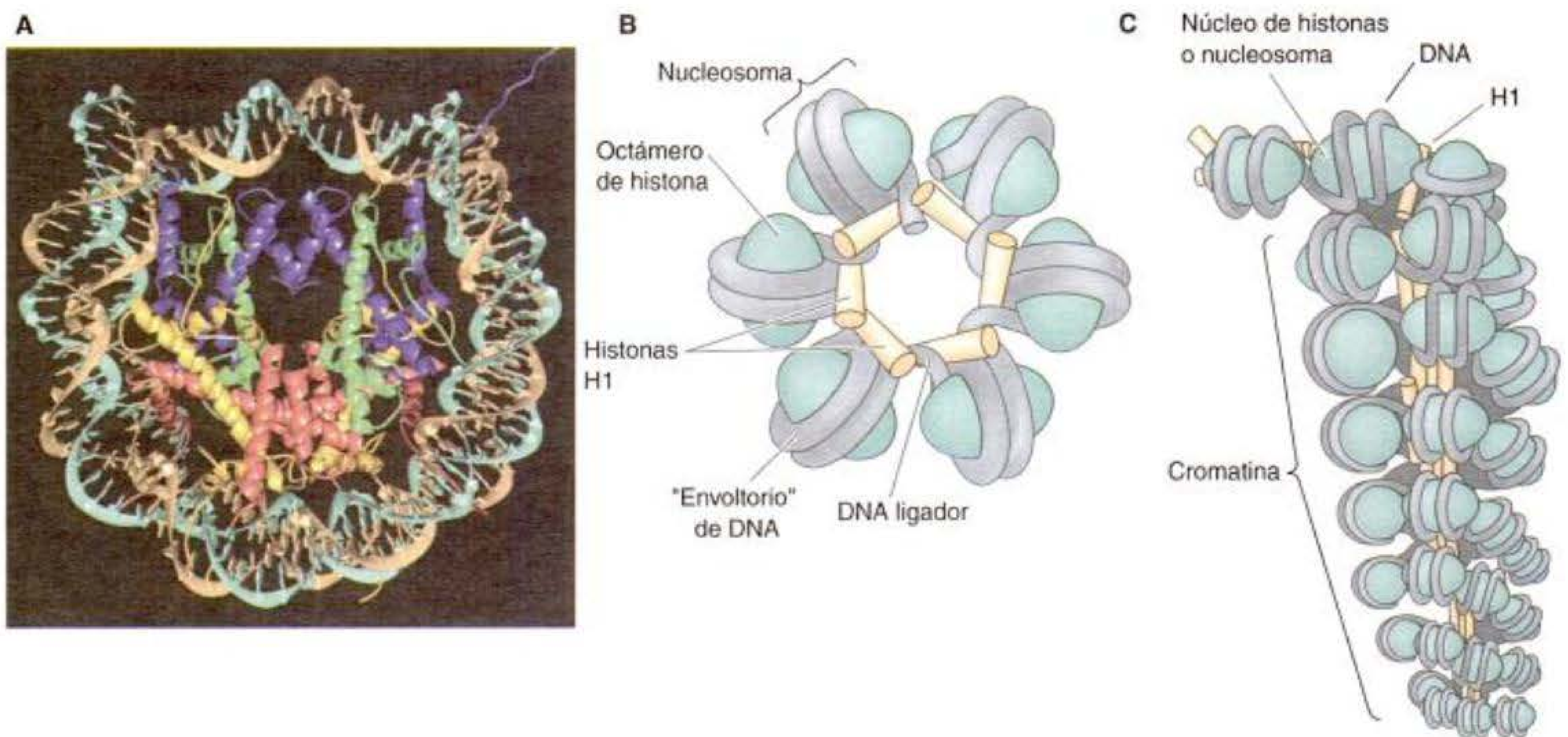


Fig. 5-1. Estructura del nucleosoma y de la cromatina. **A.** Modelo de la estructura de un nucleosoma como se observa en la cristalografía de rayos X a una resolución de 2,8 Å. Las histonas H2A y H2B son amarillas y rojas, respectivamente; H3 es violeta y H4 es verde. La hélice de DNA está enrollada alrededor del corazón de proteínas. Las colas de histona que se extienden del núcleo son los sitios de acetilación y metilación, que podrían perturbar o estabilizar, respectivamente, la formación del nucleosoma ensamblado. **B.** La histona H1 puede atraer nucleosomas a formas más compactas. Cerca de 140 pares de bases de DNA rodean a cada octámero de histonas, y cerca de 60 pares de bases de DNA unen a los nucleosomas entre sí. **C.** Modelo para la organización de los nucleosomas en una estructura de cromatina solenoidal altamente compactada. (A, de Luger y col. 1997, fotografía cortesía de los autores; B, C, según Wolfe 1993.)

Mientras que los genetistas clásicos han comparado a los genes con "las cuentas en una cuerda," los genetistas moleculares comparan a los genes con "una cuerda en las cuentas." La mayor parte del tiempo, los nucleosomas se encuentran autoenrollados en un "solenoide" apretado que es estabilizado por la histona H1. La histona H1 se une a unas 60 o más pares de bases del DNA de "conexión" entre dos nucleosomas (fig. 5-1; Weintraub 1984). Esta conformación del nucleosoma dependiente de H1 inhibe la transcripción de los genes en las células somáticas mediante el empaquetamiento de nucleosomas adyacentes en una organización más apretada que impide el ingreso hacia los genes de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa (Thoma y col. 1979; Schlissel y Brown 1984). Se piensa en general, que la condición "por defecto" de la cromatina es el estado reprimido, y que los genes específicos de tejidos llegan a ser activados mediante la interrupción local de su represión (Weintraub 1985).

> SITIO WEB 5-1 **Desplazamiento de nucleosomas (Displacing nucleosomes).** La transcripción se puede producir aun en la región de los nucleosomas. Si el promotor de un gen es accesible a la RNA polimerasa y a los factores de transcripción, la presencia del nucleosoma no inhibirá la elongación del mensaje.

La segunda diferencia es que los genes eucarióticos nos son colineares con sus productos peptídicos. En su lugar, la cadena única de ácido nucleico del mRNA eucariótico proviene de regiones del cromosoma que no son contiguas. Entre los **exones** –las regiones del DNA que codifican para una proteína– se encuentran secuencias interpuestas denominadas **intrones** que no tienen nada que ver con la secuencia de aminoácido de la proteína.* La estructura del gen típicamente eucariótico puede ser representada por el gen humano de la β-globina, mostrado en la figura 5-2. Este gen, que codifica parte de la proteína hemoglobina de los glóbulos rojos, consiste en los siguientes elementos:

1. Una región **promotora**, que es responsable de la unión de la RNA polimerasa y del comienzo posterior de la transcripción. La región promotora del gen de la β-globina humana tiene tres unidades distintas y se extiende a partir de los 95 hasta los 26 pares de bases antes ("desde corriente arriba")† del sitio de inicio de la transcripción (es decir, desde -95 a -26).
2. El **sitio de comienzo de la transcripción**, que para la β-globina humana es ACATTTG. Este sitio es a menudo denominado la **secuencia casquete (cap)** debido a que éste representa el extremo 5'del RNA, que recibirá un "casquete" de nucléotidos modificados poco después que es transcripto. Las secuencias específicas del casquete varían entre los genes.

---

* El término *exón* se refiere a la secuencia de nucleótidos cuyo RNA "sale" del núcleo. Esto ha sido tomado sobre una definición funcional de una secuencia de nucleótidos codificadora de una proteína. Las secuencias líder y 3'no transcriptas son también derivadas a partir de exones, incluso aunque no son traducidas en proteínas.

† Por convención, las direcciones corriente arriba, corriente abajo, 5´, y 3´ son especificadas en relación al RNA. De este modo, el promotor está corriente arriba de un gen, cerca de su extremo 5´.

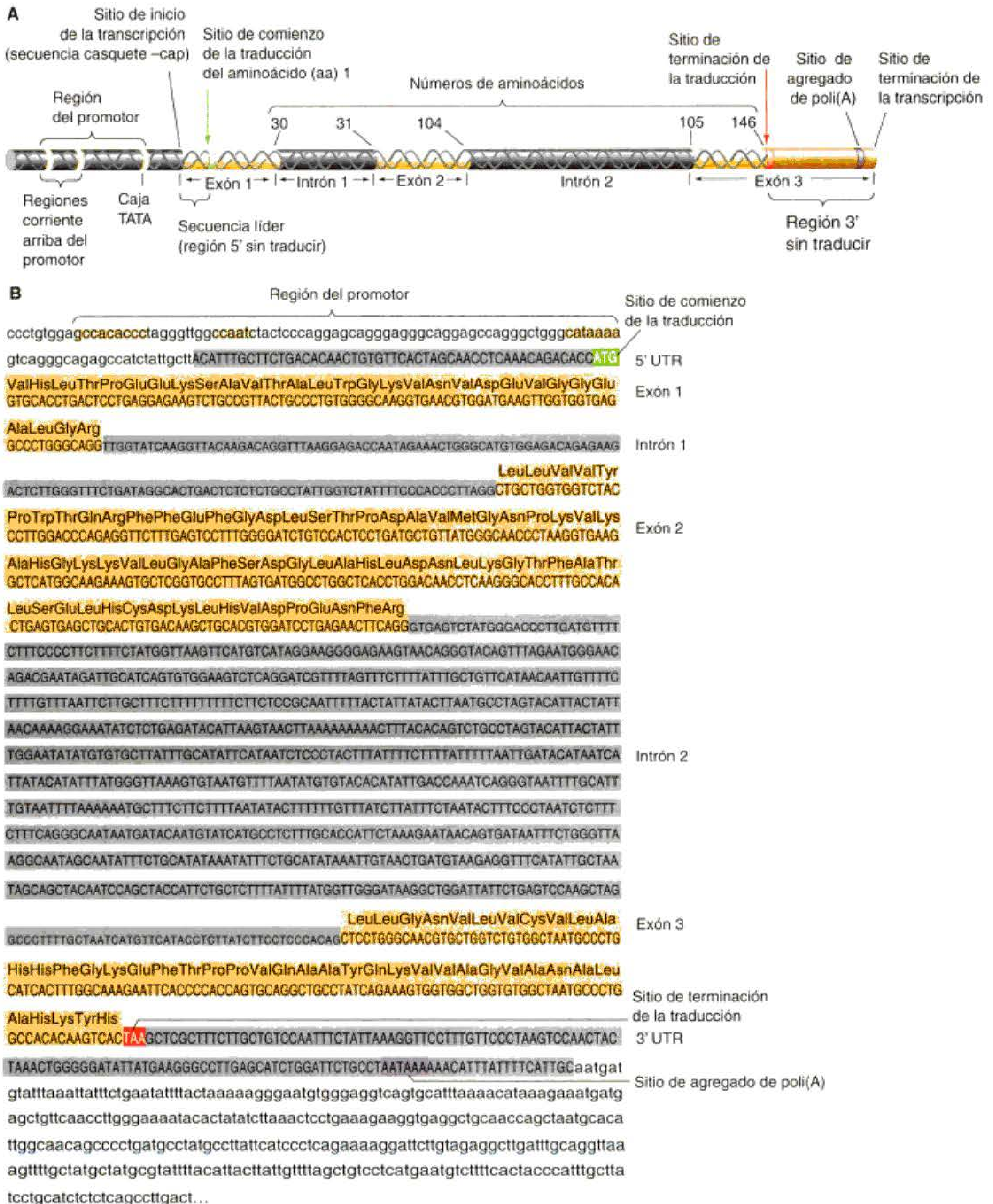


Fig. 5-2. Secuencia de nucleótidos del gen de la β-globina humana. **A.** Representación esquemática de las localizaciones de la región del promotor, de la secuencia de comienzo de la traducción (sitio casquete –cap), de la región 5' sin traducir (secuencia líder), de los exones, de los intrones y de la región 3' sin traducir del gen de la β-globina humana. Los exones son mostrados en color; los números que se encuentran es sus flancos indican las posiciones de los aminoácidos que ellos codifican en la β-globina. **B.** La secuencia de nucleótidos del gen de la β-globina humana, mostrada desde el extremo 5' hasta el extremo 3' del RNA. Los colores corresponden a sus representaciones esquemáticas en **(A)**. Las secuencias del promotor están recuadradas, como están los códigos de inicio y de terminación de la traducción ATG y TAA. Las letras mayúsculas grandes recuadradas en color son las bases de los exones, y los aminoácidos para los que ellas codifican están abreviados debajo de ellas. Las letras mayúsculas pequeñas son las bases de los intrones. Los codones representados por letras mayúsculas después del sitio de terminación de la traducción están en el mRNA de la β-globina pero no son traducidos a proteínas. Dentro de este grupo está la secuencia que se piensa es necesaria para la poliadenilación. Por convención, solamente se muestra la cadena de la doble hélice de DNA parecida a la del RNA. (B de Lawn y col. 1980.)

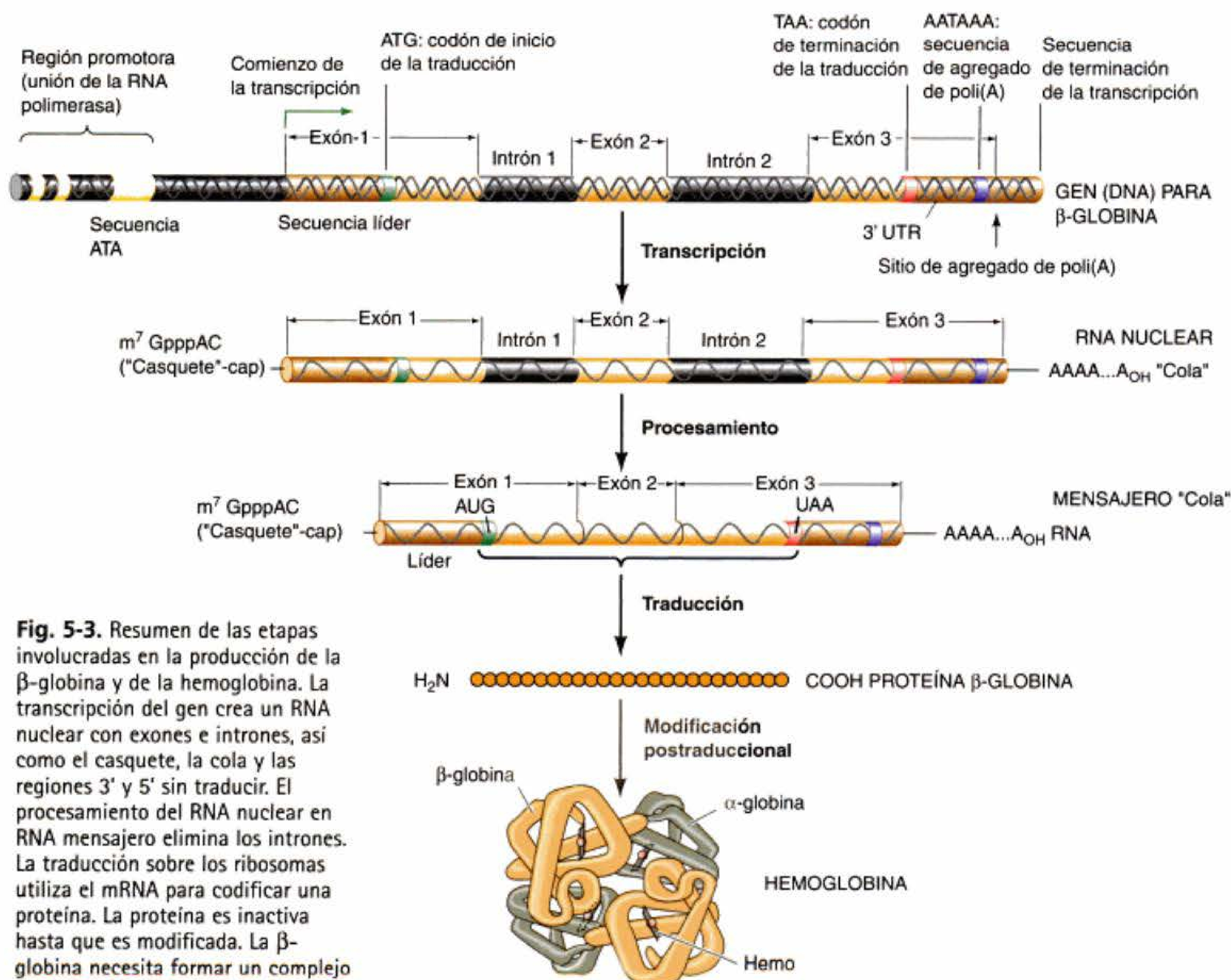


Fig. 5-3. Resumen de las etapas involucradas en la producción de la β-globina y de la hemoglobina. La transcripción del gen crea un RNA nuclear con exones e intrones, así como el casquete, la cola y las regiones 3' y 5' sin traducir. El procesamiento del RNA nuclear en RNA mensajero elimina los intrones. La traducción sobre los ribosomas utiliza el mRNA para codificar una proteína. La proteína es inactiva hasta que es modificada. La β-globina necesita formar un complejo con la α-globina y el hemo para llegar a ser activa.

3. El **sitio de comienzo de la traducción**, ATG. Este codón (que llega a ser AUG en el mRNA) se encuentra localizado unos 50 pares de bases después del sitio de comienzo de la transcripción en el gen de la β-globina humana (aunque esta distancia difiere considerablemente entre los diferentes genes). La secuencia de 50 pares de bases interpuesta entre los puntos de iniciación de la transcripción y de la traducción es la región **5' no traducida**, denominada con frecuencia **5' UTR** o **secuencia líder**. La 5'UTR puede determinar el ritmo en el que la traducción comienza.
4. El primer **exón**, que contiene 90 pares de bases que codifican para los aminoácidos 1-30 de la β-globina.
5. Un **intrón** con 130 pares de bases con secuencias no codificantes para la proteína de la β-globina. La estructura de este intrón es importante para permitir el procesamiento del RNA en un mensajero de RNA y salir del núcleo.
6. Un exón con 222 pares de bases que codifican los aminoácidos 31-104.
7. Un intrón de gran tamaño –850 pares de bases– que no tiene nada que ver con la estructura de la proteína globina.
8. Un exón con 126 pares de bases que codifican para los aminoácidos 105-146.
9. Un **codón de terminación de la traducción**, TAA. Este codón se convierte a UAA en el mRNA. El ribosoma se disocia en este codón, y la proteína es liberada.
10. Una **región 3' no traducible** (3' UTR) que, aunque transcripta, no es traducida en proteína. Esta región incluye la secuencia AATAAA, que es necesaria para la **poliadenilación**: poner una "cola" de unos 200 a 300 residuos de adenilato en el transcripto de RNA. Esta **cola poli(A)** 1) le otorga estabilidad al mRNA, 2) le permite al mRNA salir del núcleo y 3) le permite al mRNA ser transcripto a proteína. Esta cola de poli(A) se inserta dentro del RNA cerca de unas 20 bases corriente abajo de la secuencia AAUAAA. La transcripción continúa más allá del sitio AATAAA cerca de unos 1.000 nucleótidos antes de ser finalizada.

El transcripto de RNA nuclear original para genes como el de la β-globina contiene la secuencia del casquete (cap), la región 5' no traducible, exones, intrones y la región 3' no traducible (fig. 5-3). Ambos extremos de estos transcriptos son modificados antes de que estos

RNA dejen el núcleo. Un casquete que consiste en guanosina metilada es colocado en el extremo 5' del RNA en polaridad opuesta al RNA mismo. Esto significa que no hay grupos fosfato 5' libres en el RNA nuclear. El casquete 5' es necesario para la unión del mRNA al ribosoma y para posteriores traducciones (Shatkin 1976). La terminal 3' es en general modificada en el núcleo mediante el agregado de una cola de poli(A). Los residuos de adenilato en esta cola son reunidos enzimáticamente y son agregados al transcripto; ellos no son parte de la secuencia del gen. Las modificaciones 5' y 3' pueden proteger al mRNA de las exonucleasas que de otro modo pueden digerirla (Sheiness y Darnell 1973, Gedamu y Dixon 1978). Las modificaciones por lo tanto estabilizan al mensajero y a sus precursores.

SITIO WEB 5-2 **Estructura del casquete 5' (Structure of the 5'cap).** La formación del casquete y la metilación del extremo 5' constituyen etapas críticas en la síntesis del mRNA. Si el casquete está ausente o no está metilado, podría no producirse la traducción.

Anatomía del gen: promotores y potenciadores

Además de la región codificadora de la proteína del gen, hay secuencias reguladoras que pueden ser localizadas en cualquier extremo del gen (o incluso dentro de éste). Estas secuencias –los promotores y los potenciadores o intensificadores (enhancers)– son necesarias para controlar dónde y cuándo un gen particular es transcripto.

Los **promotores** son los sitios donde la RNA polimerasa se une al DNA para dar comienzo a la transcripción. Los promotores de los genes que sintetizan RNA mensajeros (es decir, genes que codifican proteínas*) están localizados por lo general inmediatamente corriente arriba del sitio donde la RNA polimerasa da comienzo a la transcripción. La mayoría de estos promotores contienen la secuencia TATA, a la que se unirá la RNA polimerasa (fig. 5-4). Este sitio, conocido como la **caja TATA**, se encuentra generalmente cerca de unas 30 pares de bases corriente arriba del sitio donde es transcripta la primer base. Las RNA polimerasas de eucariontes, sin embargo, no se unirán a esta secuencia de DNA desnudo. En su lugar, para unirse eficientemente al promotor, requieren la presencia de proteínas adicionales, denominadas **factores de transcripción**. Los genes que codifican proteínas son transcriptos por la RNA polimerasa II, y se ha visto que al menos seis proteínas nucleares son necesarias para el adecuado comienzo de la transcripción por esta polimerasa (Buratowski y col. 1989; Sopta y col. 1989). Estas proteínas nucleares son denominadas **factores de transcripción basales**.

* Hay varios tipos de RNA que no codifican proteínas. Éstos incluyen a los RNA ribosómicos y a los RNA de transferencia (que son utilizados en la síntesis de proteínas) y los RNA nucleares pequeños (que son utilizados en el procesamiento del RNA). Además, hay RNA reguladores (tales como *Xist* y *lin-4*, que se discutirán posteriormente en este capítulo) que están involucrados en la regulación de la expresión del gen (y que no son traducidos a péptidos)

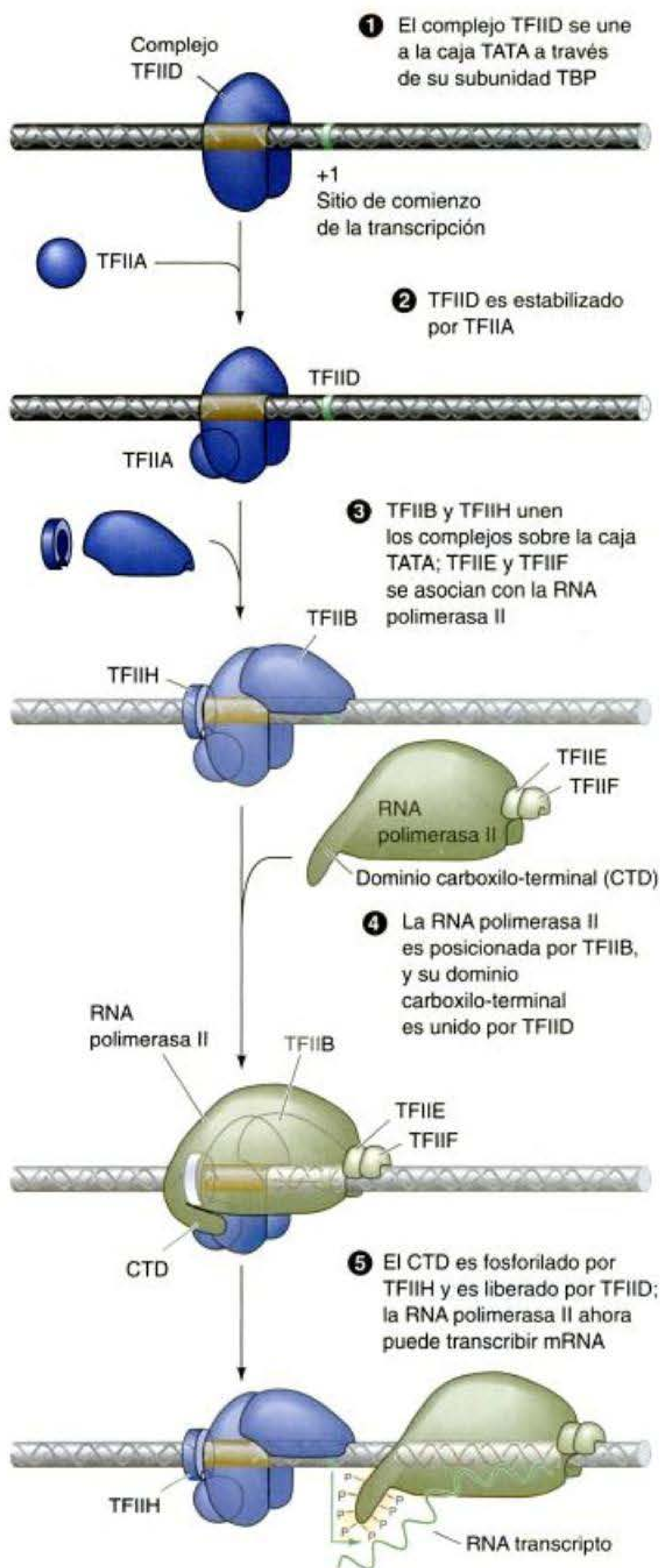


Fig. 5-4. Formación del complejo activo de iniciación de la transcripción eucariótica. Los diagramas representan el complejo formado sobre la caja TATA mediante los factores de transcripción basal y la RNA polimerasa II.

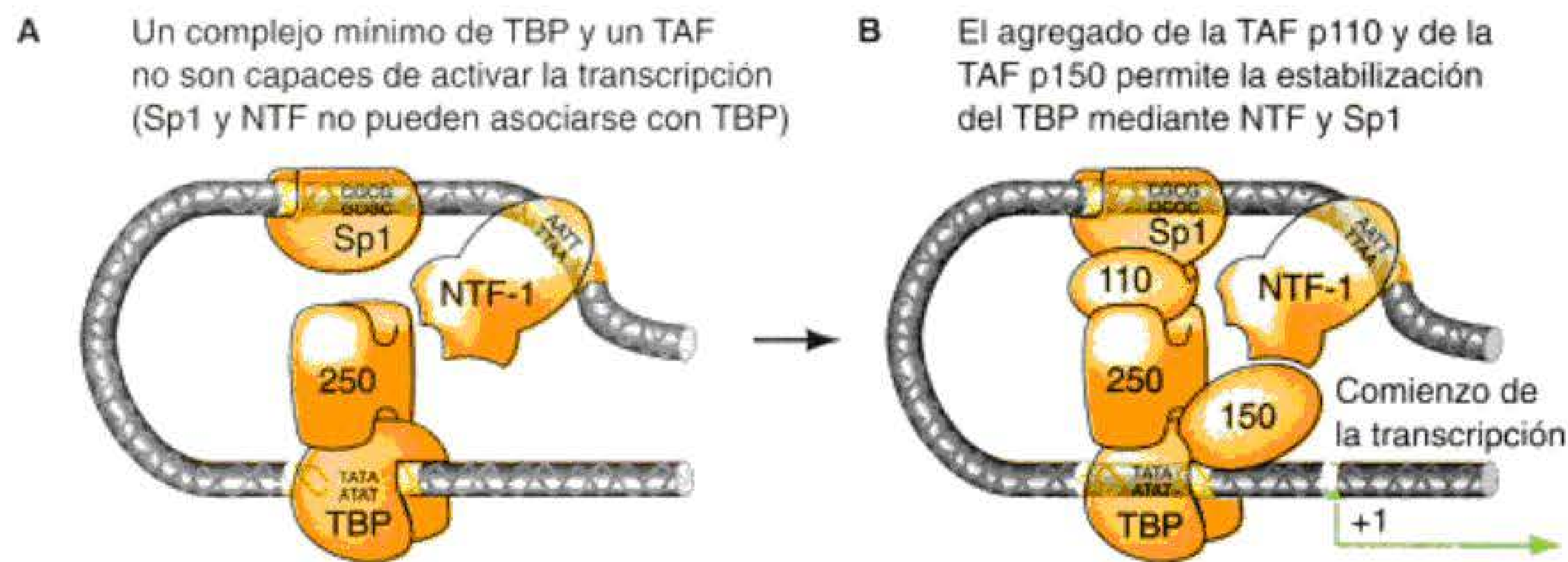


Fig. 5-5. Modelo de la estabilización de TAF de TBP. **A.** Un complejo mínimo cerca del promotor, con TBP sobre la caja TATA del promotor y dos elementos promotores corriente arriba ocupados por dos factores de transcripción, Sp1 y NTF-1. Un TAF, $TAF_{II}250$, es unido al TBP, pero este complejo no es lo suficientemente estable como para activar la transcripción. **B.** Cuando otros TAF se unen a estas proteínas, sin embargo, forman puentes que estabilizan al TBP sobre el promotor. (Según Chen y col. 1995.)

El primer factor de transcripción basal, **TFIID** (del inglés: **t**ranscription **f**actor **IID**),* reconoce a la caja TATA a través de una de sus subunidades, **proteína de unión a TATA** (**TBP** del inglés: *TATA-binding protein*). TFIID sirve como base para los complejos de iniciación de la transcripción, y también impide la formación de los nucleosomas en esta región. Una vez que TFIID es estabilizado por el factor de transcripción basal, **TFIIA**, llega a ser capaz de unirse a **TFIIB**. Una vez que TFIIB está en su lugar, la RNA polimerasa puede unirse al complejo. Otros factores de transcripción (TFIIE, F y H) son luego utilizados para liberar a la RNA polimerasa de los complejos de modo tal que ésta pueda transcribir el gen, y para desenrollar la hélice de DNA de manera tal que la RNA polimerasa tenga una cadena molde libre a partir de la cual transcribir.

La capacidad de los factores de transcripción basales para interactuar con la RNA polimerasa es regulada por dos grupos de proteínas, los **factores asociados a las TBP** (**TAF,** del inglés *TBP-associated factors*) y el **complejo mediador** (Myers y Kornberg 2000; Baek y col. 2002). El complejo mediador contiene cerca de veinticinco proteínas que pueden modular la actividad de la RNA polimerasa II y del TFIIH, un factor de transcripción basal que es crítico en permitir a la RNA polimerasa II dar comienzo a la transcripción (Woychik y Hampsey 2002). Las TAF estabilizan el TBP (fig. 5-5; Buratowski 1997; Lee y Young 1998). Esta función es crítica para la transcripción del gen, debido a que si el TBP no es estabilizado, esta puede caerse de la pequeña secuencia de TATA. Las TAF son unidas sobre el DNA a través de **elementos promotores corriente arriba**. Estas secuencias de DNA están cerca de la caja TATA (por lo general corriente arriba de ellas). Sin embargo, cada TAF no necesita estar presente en cada una de las células del cuerpo. Los **factores de transcripción específicos de la célula** (como la proteína Pax6 mencionada en el capítulo 4) pueden además activar al gen mediante la estabilización del complejo de inicio de la transcripción. Ellos pueden hacerlo mediante la unión a las TAF, o al unir directamente a otros factores como TFIIB. Ellos también pueden facilitar la transcripción al desestabilizar a los nucleosomas (como se verá más adelante).

SITIO WEB 5-3 **Estructura del promotor y los mecanismos de ensamblaje del complejo de transcripción (Promoter structure and the mechanism of transcription complex asembly).** Conseguir la RNA polimerasa para un promotor no es una tarea fácil. El complejo de inicio de la transcripción es un complejo de proteínas principales que deben ser creadas en cada ronda de transcripción. El trazado de las distintas partes de los promotores se obtiene a través de mutaciones y transgenes.

Un **potenciador o intensificador** (**enhancer**) es una secuencia de DNA que activa la utilización de un promotor, controlando la eficiencia y grado de transcripción de un promotor. Los potenciadores pueden activar únicamente a los promotores *cis*-relacionados (es decir, los promotores sobre el mismo cromosoma*), pero pueden hacerlo a grandes distancias (algunas tan grandes como 50 kilobases alejadas del promotor). Además, los potenciadores no necesitan estar sobre el lado 5'(corriente arriba) del gen; ellos pueden estar también en el extremo 3', en los intrones, o incluso sobre la cadena de DNA complementario (Maniatis y col. 1987). El gen humano de la β-globina tiene un potenciador en su 3' UTR, de

* TF indica factor de transcripción (del inglés: *transcription factor*); II indica que se encontró que el factor era necesario para la RNA polimerasa II, y la designación de la letra refiere a las fracciones activas utilizadas a partir de las columnas de fosfocelulosa para purificar a estas proteínas.

* Los elementos reguladores *cis* y *trans* son denominados de este modo debido a la analogía con la genética de *E. coli* y con la química orgánica. Así, los elementos *cis* son elementos reguladores que residen sobre la misma cadena de DNA (*cis*-, "sobre el mismo lado"), mientras que los elementos *trans* son aquellos que pueden ser suministrados a partir de otro cromosoma (*trans*-, "en el otro lado de"). El término elementos reguladores *cis* ahora se refiere a aquellas secuencias de DNA que regulan un gen sobre el mismo tramo de DNA (es decir, los promotores y potenciadores). Los factores reguladores *trans* son moléculas solubles cuyos genes están localizados en otro lugar en el genoma y que se unen a los elementos reguladores *cis*. Ellos son usualmente factores de transcripción.

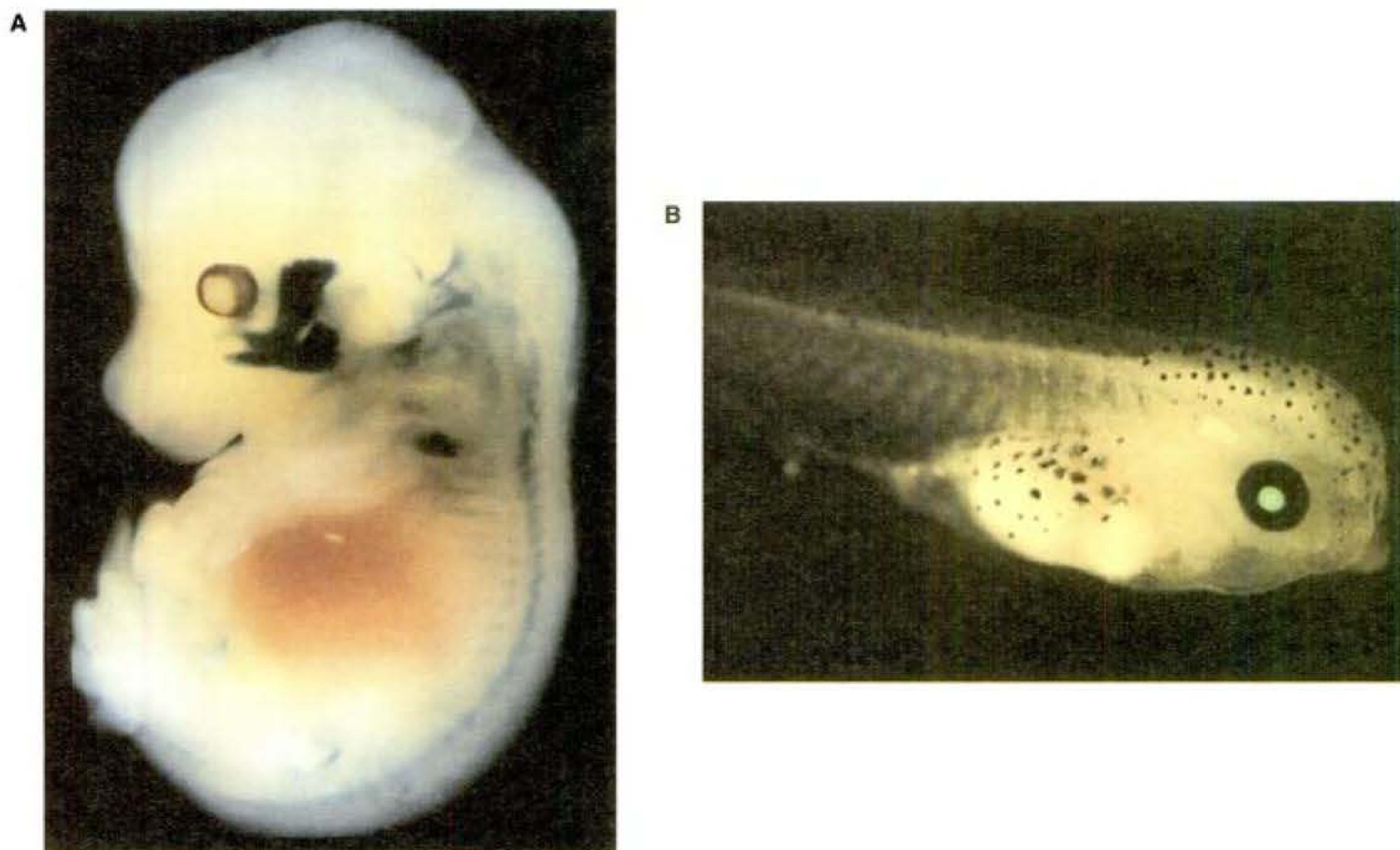


Fig. 5-6. Los elementos genéticos reguladores de la transcripción tejido-específica pueden identificarse mediante la fusión de genes reporteros a regiones sospechosas de potenciadores de genes expresados en tipos celulares particulares. **A.** La región potenciadora del gen codificador de la proteína específica de músculo Myf-5 es fusionada a un gen reportero β-galactosidasa e incorporada a un embrión de ratón. Cuando se tiñe para la actividad de β-galactosidasa (región teñida de oscuro), los embriones de ratón de 13,5 días muestran que el gen reportero es expresado en los músculos del ojo, los músculos faciales, los músculos de las extremidades anteriores, los músculos del cuello y los miotomos segmentados (que dan origen a los músculos de la espalda). **B.** El gen para la proteína fluorescente verde (GFP) es fusionado al potenciador de cristalina del cristalino de *Xenopus tropicalis*. El resultado es la expresión de GFP en el cristalino de los renacuajos. (**A**, fotografía cortesía de A. Patapoutian y B. Wold; **B** de Offield y col. 2000, fotografía cortesía de R. Grainger.)

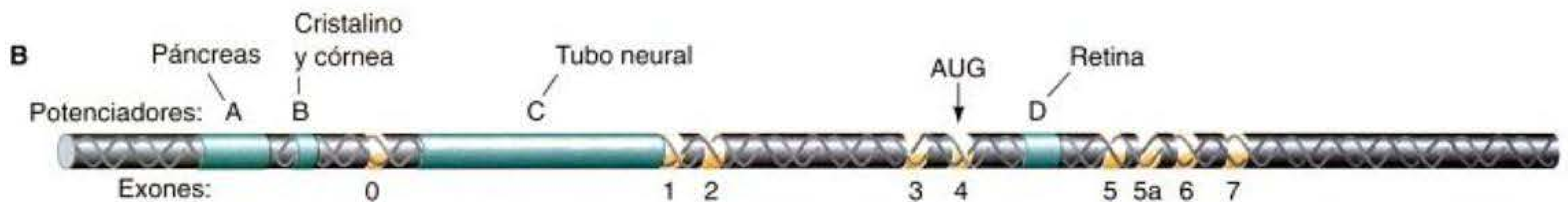
aproximadamente 700 pares de bases corriente abajo a partir del sitio AATAAA. Esta secuencia potenciadora es necesaria para la expresión temporal y tisular específica del gen de la β-globina en los precursores celulares de los glóbulos rojos del adulto (Trudel y Constantini 1987). Igual que los promotores, los potenciadores funcionan mediante la unión de proteínas reguladoras específicas denominadas factores de transcripción.

Los potenciadores pueden regular la expresión temporal y tisular específica de cualquier gen regulado de manera diferencial, pero normalmente diferentes tipos de genes tienen diferentes potenciadores. Por ejemplo, los genes que codifican a las proteínas *exocrinas* del páncreas (las proteínas digestivas quimotripsina, amilasa y tripsina) tienen diferentes potenciadores de aquellos genes que codifican las proteínas *endocrinas* del páncreas (como insulina). Estos potenciadores se localizan en las secuencias de sus genes que flanquean 5' (Walter y col. 1983).

Uno de los principales métodos de identificación de secuencias potenciadoras debe clonar secuencias de DNA que flanquean los genes de interés y fusionarlas con **genes reporteros** cuyos productos no son producidos por lo general en las células y que pueden ser identificados fácilmente. Las construcciones de los posibles potenciadores y de los genes reporteros pueden insertarse en los embriones, y a continuación puede observarse la expresión del gen reportero. Si la secuencia contiene un potenciador, el gen reportero debe llegar a activarse en tiempo y lugares específicos. Por ejemplo, el gen **β-galactosidasa** de *E. coli* (el gen *lacZ*) puede utilizarse como un gen reportero y fusionarse con un potenciador que normalmente dirige la expresión de un gen particular de ratón en músculos. Si el transgén obtenido es inyectado en un ovocito de ratón recientemente fecundado y llega a ser incorporado en su DNA, β-galactosidasa será expresada en las células musculares de ratón. Mediante la tinción para la presencia de β-galactosidasa, el patrón de expresión de este gen específico de músculo puede ser visto (fig. 5-6A). Del mismo modo, se demostró que una secuencia flanqueando a la proteína cristalina del cristalino en *Xenopus* era un potenciador. Cuando esta secuencia era fusionada con un gen reportero para la **proteína fluorescente verde (GFP** –del inglés *green fluorescent protein*–, una proteína que usualmente se encuentra sólo en las medusas), la expresión de GFP fue vista únicamente en el cristalino (fig. 5-6B; Offield y col. 2000). Los genes reporteros para GFP son muy útiles debido a que ellos pueden ser monitoreados en embriones vivos y por lo tanto los cambios en la expresión del gen pueden ser vistos en organismos individuales.



Fig. 5-7. Regiones reguladoras del gen *Pax6* de ratón. **A.** Una secuencia en un potenciador corriente arriba del gen *Pax6* dirige la expresión de un transgén reportero de *lacZ* en el ectodermo superficial que recubre la cúpula óptica, como muestra por la tinción oscura en dicha área. **B.** Mapa de sitios potenciadores del gen *Pax6*, basado en los estudios de gen reportero. El gen tiene dos promotores principales (en exones 0 y 1, respectivamente) cada uno de lo cuales puede iniciar la transcripción del mismo RNA. El codón de inicio de la traducción está en el exón 4. (El exón 5a es un exón empalmado de manera alternativa, discutido en el texto.) Las regiones A-D son potenciadores que activan al gen *Pax6* en el páncreas, el cristalino, el tubo neural y la retina, respectivamente. El patrón de expresión de la región B se muestra en (A). (A, de Williams y col. 1998; B, según Kammandel y col. 1998.)



Los potenciadores están divididos en módulos. Como se verá en breve, si una proteína es sintetizada en varios tejidos, pueden haber potenciadores separados dirigiendo a los genes a ser expresados en diferentes sitios. El gen *Pax6* de ratón, por ejemplo, es expresado en el cristalino, en la retina, en el tubo neural y en el páncreas. Las regiones reguladoras del gen *Pax6* de ratón fueron descubiertas tomando regiones a partir de sus secuencias flanco 5' e intrones y fusionándolas a un gen reportero *lacZ*. Cada uno de estos transgenes fue luego microinyectado en los pronucleos de ratón recién fecundados, y los embriones obtenidos fueron teñidos para β-galactosidasa (fig. 5-7A; Kammandel y col. 1998; Williams y col. 1998). Los resultados están resumidos en la figura 5-7B. El potenciador más alejado corriente arriba del promotor contiene las regiones necesarias para la expresión de *Pax6* en el páncreas, mientras que un segundo potenciador activa la expresión de *Pax6* en el ectodermo superficial (cristalino, córnea y conjuntiva). Un tercer potenciador reside en la secuencia líder; ésta contiene las secuencias que dirigen la expresión de *Pax6* en el tubo neural. Una cuarta secuencia potenciadora, localizada en un intrón poco después del sitio de inicio de traducción, determina la expresión de *Pax6* en la retina.

Los potenciadores son críticos en la regulación del desarrollo normal. Durante la década de 1990, ocho generalizaciones han emergido que ponen de relieve su importancia para la expresión génica diferencial:

1. La mayoría de los genes requieren de potenciadores para su transcripción.
2. Los potenciadores son el principal determinante de la transcripción diferencial en el espacio (tipo celular) y en el tiempo.
3. La capacidad de un potenciador para funcionar mientras está distante del promotor significa que puede haber múltiples señales para determinar si un gen dado se transcribe. Un gen dado puede tener varios sitios potenciadores relacionados a él, y cada potenciador puede estar unido por más de un factor de transcripción.
4. Se piensa que la transcripción es regulada por una interacción entre los factores de transcripción unidos a los sitios potenciadores y los complejos de la iniciación de la transcripción ensamblados en el promotor. Los mecanismos de esta asociación no se conocen por completo, ni tampoco se comprende cómo hace el promotor para integrar todas estas señales.
5. Los potenciadores son combinatorios. Varias secuencias de DNA regulan la expresión temporal y espacial del gen, y pueden ser mezcladas y combinadas. Por ejemplo, los potenciadores para las hormonas endocrinas, como la insulina, y para las proteínas específicas del cristalino, como las cristalinas tienen sitios que unen la proteína Pax6. Pero Pax6 sola no le dice al cristalino que produzca insulina o al páncreas que produzca cristalinas; hay otras factores de transcripción proteicos que además deben unirse. Es la *combinación* de los factores de transcripción lo que lleva a que genes específicos sean transcriptos.
6. Los potenciadores tienen módulos. Un gen puede tener varios elementos potenciadores, cada uno encendiéndose en un grupo diferente de células.
7. Los potenciadores generalmente activan la transcripción por uno de dos medios: ellos remodelan la cromatina para exponer el promotor, o ellos facilitan la unión de la RNA polimerasa al promotor al estabilizar las TAF.
8. Los potenciadores pueden también *inhibir* la transcripción. En algunos casos, los mismos factores de transcripción que activan la transcripción de un gen pueden reprimir la transcripción de otros genes. Estos "potenciadores negativos" son en ocasiones denominados **silenciadores**.

Factores de transcripción

Como se ha visto, los factores de transcripción son proteínas que se unen a una región potenciadora o promotora e interactúan para activar o reprimir la transcripción de un gen particular. La mayoría de los factores de transcripción pueden unirse a secuencias de DNA específicas.

Cuadro 5-1 *Algunas de las principales familias y subfamilias de los factores de transcripción*

Familia	*Factores de transcripción representativos*	*Algunas funciones*
Homeodominio:		
Hox	Hoxa-1, Hoxb2, etc.	Formación del eje
POU	Pit-1, Unc-86, Oct-2	Desarrollo de la hipófisis; destino neural
LIM	Lim-1, Forkhead	Desarrollo de la cabeza
Pax	Pax 1, 2, 3, 6, etc.	Especificación neural; desarrollo del ojo
Básico hélice-bucle-hélice (bHLH) (Basic helix-loop-helix)	MyoD, MITF, daughterless	Especificación de músculo y neuronal; determinación del sexo de *Drosophila*; pigmentación
Básico cremallera de leucina (bZip) (Basic leucine zipper)	C/EBP, AP1	Diferenciación del hígado; especificación del destino celular adiposo
Dedo de cinc (Zinc finger)		
Estándar	WT1, Krüppel, Engrailed	Desarrollo del riñón, de la gónada y del macrófago; segmentación de *Drosophila*.
Receptores de hormonas nucleares	Receptor de glucocorticoide, receptor de estrógeno, receptor de testosterona, receptores de ácido retinoico	Determinación sexual secundaria; desarrollo craneofacial; desarrollo de los miembros
Sry-Sox	Sry, SoxD, Sox2	Doblar el DNA; determinación sexual primaria de mamíferos; diferenciación ectodérmica

Estas proteínas pueden ser agrupadas en familias basadas en las similitudes en su estructura (cuadro 5-1). Los factores de transcripción dentro de una determinada familia comparten un armazón estructural común en sus sitios de unión al DNA, y leves diferencias en los aminoácidos en el sitio de unión pueden llevar a que el sitio de unión reconozca diferentes secuencias de DNA.

> SITIO WEB 5-4 **Familias de los factores de transcripción (Families of transcription factors).** Hay varias familias de factores de transcripción agrupadas por sus similitudes estructurales y sus mecanismos de acción. Los factores de transcripción de homeodominio son importantes en la especificación del eje anteroposterior, y los receptores de hormonas actúan como mediadores en los efectos de las hormonas en los genes.

Los factores de transcripción pueden tener tres dominios principales. El primero es un **dominio de unión al DNA** que reconoce una secuencia particular de DNA. El segundo es un **dominio activador-*trans*** que activa o suprime la transcripción del gen a cuyo promotor o potenciador se ha unido. En general, este dominio activador-*trans* le permite al factor de transcripción interactuar con las proteínas involucradas en la unión de la RNA polimerasa (como TFIIB o TFIIE; véase Sauer y col. 1995). Además, éstos pueden tener un **dominio de interacción proteína-proteína** que permite modular la actividad del factor de transcripción por las TAF u otros factores de transcripción. Se discutirá el funcionamiento de los factores de transcripción mediante el análisis de dos ejemplos: MITF y *Pax6*.

MITF. La proteína microftalmia (MITF) es un factor de transcripción que es activo en el oído y en las células formadoras de pigmento del ojo y de la piel. Los humanos heterocigotas para una mutación del gen que codifica MITF están sordos, tienen iris multicoloreados y tienen un mechón blanco en sus cabellos (véase cap. 21). La proteína MITF es un factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice (véase cuadro 5-1) que tiene tres dominios funcionalmente importantes. En primer lugar, MITF tiene un dominio de interacción proteína-proteína que le permite dimerizarse con otra proteína MITF (Ferré-D'Amaré y col. 1993). El homodímero resultante (dos proteínas MITF unidas conjuntamente) forma la proteína funcional que puede unirse al DNA y activar la transcripción de ciertos genes (fig. 5-8). La segunda región, el dominio de unión al DNA, está próxima al extremo amino terminal de la proteína y contiene numerosos aminoácidos básicos que hacen contacto con el DNA (Hemesath y col. 1994; Steingrímsson y col. 1994). Esta función fue confirmada mediante el descubrimiento de varias mutaciones humanas y de ratón que mapean dentro del sitio de unión al DNA para MITF y que impiden la unión de la proteína MITF al

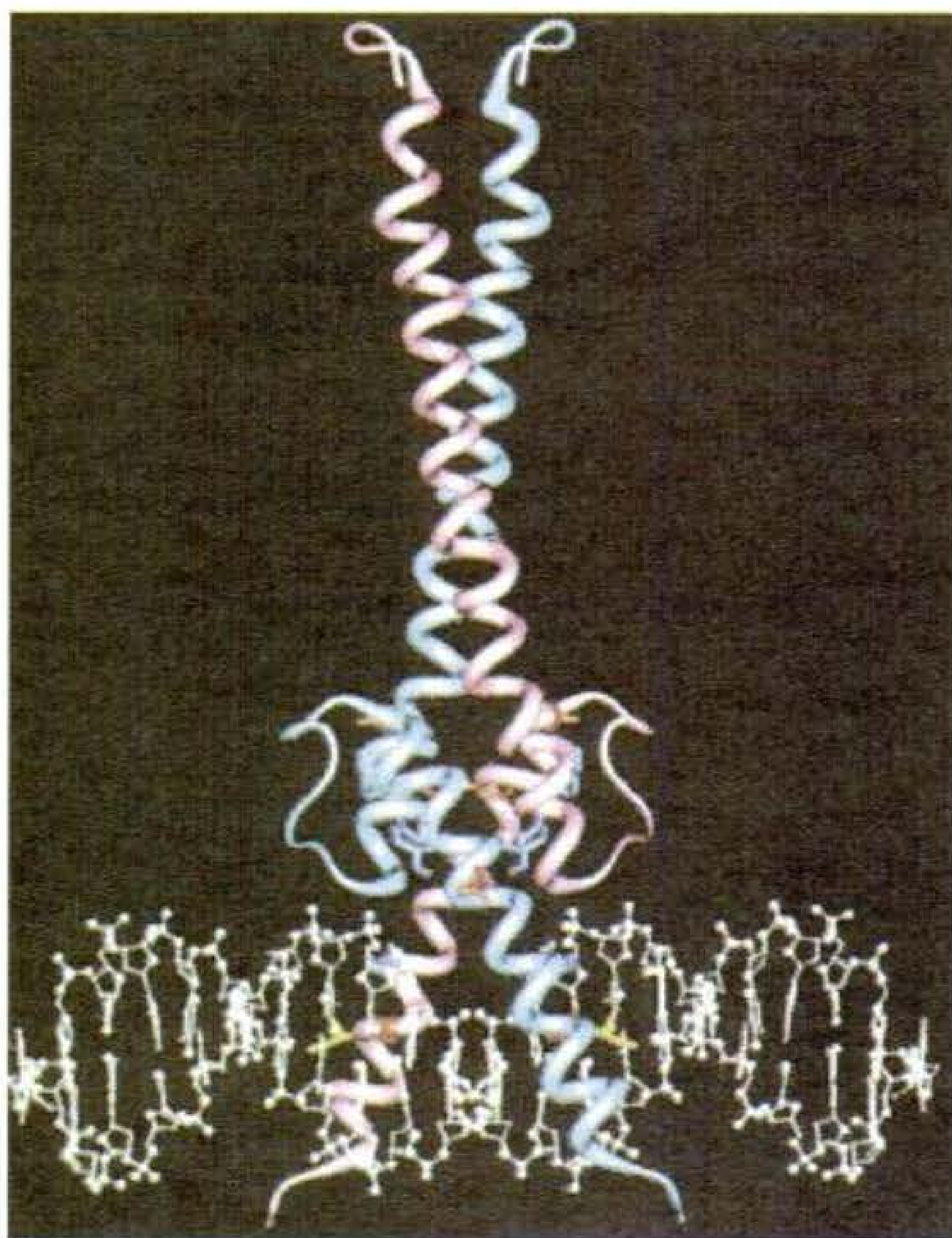


Fig. 5-8. Modelo tridimensional del homodímero MITF (una proteína en rojo, la otra en azul) unido a un elemento promotor en el DNA (blanco). El amino terminal está localizado en el pie de la figura y forma el dominio de unión al DNA. El dominio de interacción proteína-proteína está localizado inmediatamente por arriba. El extremo carboxilo de la molécula se piensa que es el dominio *trans*-activador que une la proteína co-activadora p300/CBP. (Según Steingrimsson y col. 1994; fotografía cortesía de N. Jenkins.)

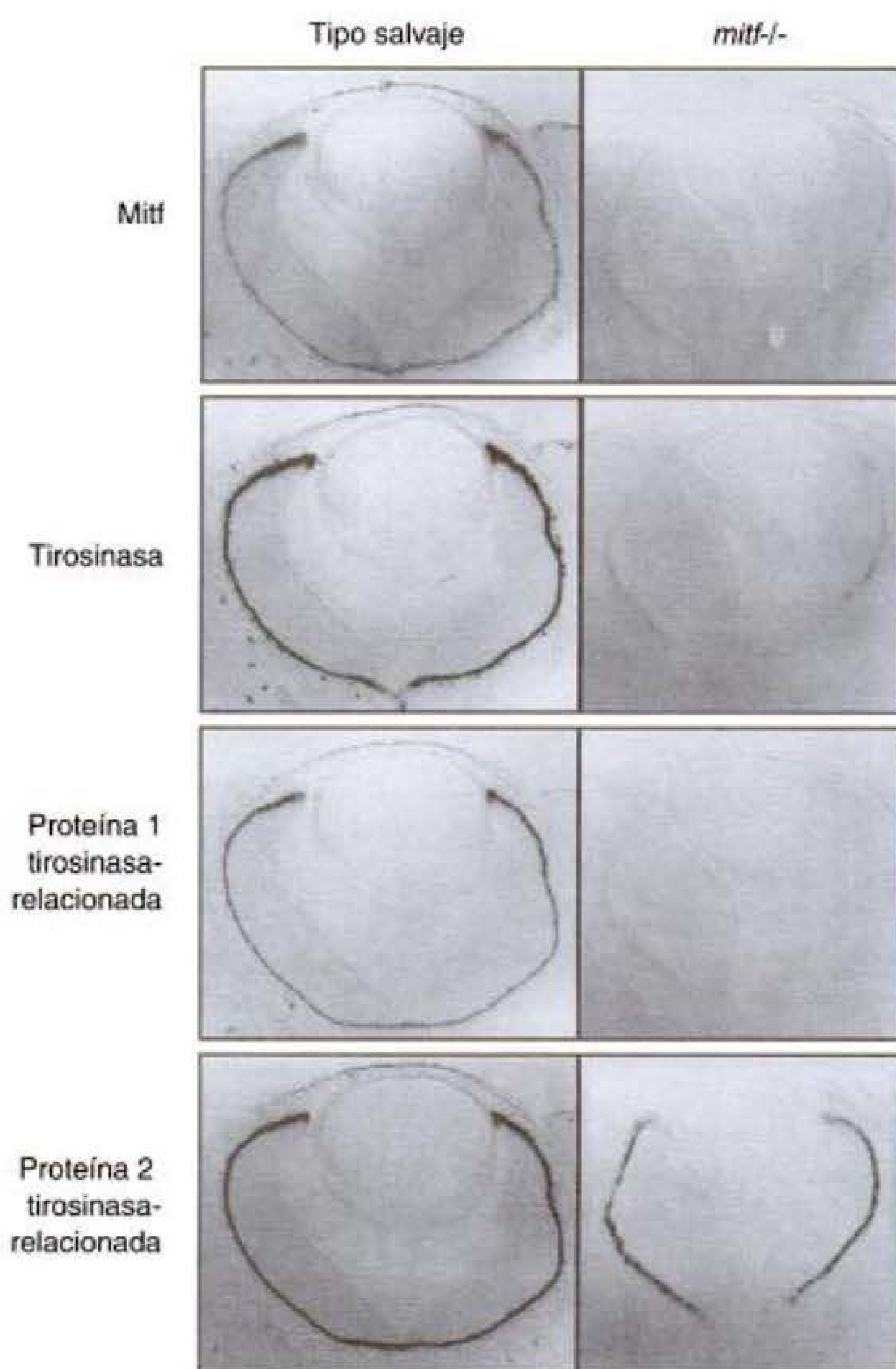


Fig. 5-9. MITF es requerido para la transcripción de los genes de pigmentación. Se muestran secciones seriadas del ojo en embriones de ratón de 15,5 días. En los embriones de ratón tipo salvaje, la hibridación in situ revela la presencia del mRNA *Mitf* (tinción oscura) en la capa epitelial pigmentaria de la retina. En el embrión mutante mi (*mitf*-/-), MITF no está presente. MITF reconoce a los sitios promotores en tres genes que codifican enzimas involucradas en la producción de melanina. En el mutante *mitf*-/-, los genes codificadores de esas enzimas tampoco son transcriptos, comparados con el ratón tipo salvaje. La transcripción del gen de la proteína tirosinasa-relacionada 2 está significativamente reducida en el mutante. (De Nakayama y col. 1998; fotografía cortesía de H. Arnheiter.)

DNA. Las secuencias para la unión de MITF han sido halladas en las regiones del promotor de genes que codifican tres proteínas de pigmento celular específico de la familia tirosinasa (Bentley y col. 1994; Yasumoto y col. 1997). Sin MITF, estas proteínas no son sintetizadas correctamente (fig. 5-9) y no se produce el pigmento melanina. Todos estos promotores contienen la misma secuencia de 11 pares de bases, incluyendo la secuencia básica CATGTG, reconocida por MITF.

La tercera región funcional de MITF es su dominio de activación-*trans*. Este dominio incluye a un largo tramo de aminoácidos en el centro de la proteína. Cuando el dímero MITF se une a su secuencia de interés en un promotor o potenciador, la región activadora-*trans* permite la unión de un TAF denominado p300/CBP. La proteína p300/CBP es una enzima **histona acetiltransferasa** que puede transferir grupos acetilo a cada histona en los nucleosomas (Ogryzko y col. 1996; Price y col. 1998). La acetilación desestabiliza a los nucleosomas y permite la expresión de los genes para enzimas formadoras de pigmento.

Los descubrimientos recientes han mostrado que numerosos factores de transcripción operan mediante el reclutamiento de histonas acetiltransferasas. Cuando las proteínas de histonas son acetiladas, los nucleosomas se dispersan, permitiendo a otros factores de transcripción y a la RNA polimerasa acceder al sitio. Algunas TAF, como la $TAF_{II}250$, son en sí mismas histonas acetiltransferasas, de modo tal que pueden activar la transcripción mediante la desestabilización del nucleosoma y al pemitirle a la proteína TBP unirse al DNA para establecer un sitio de unión de la RNA polimerasa (fig. 5-10; Mizzen y col. 1996).

SITIO WEB 5.6 **Acetilación de histonas (Histone acetylation).** La acetilación de histonas es una etapa crítica para despejar el camino para los complejos que dan comienzo a la transcripción. La cromatina sin represión se caracteriza por histonas acetiladas.

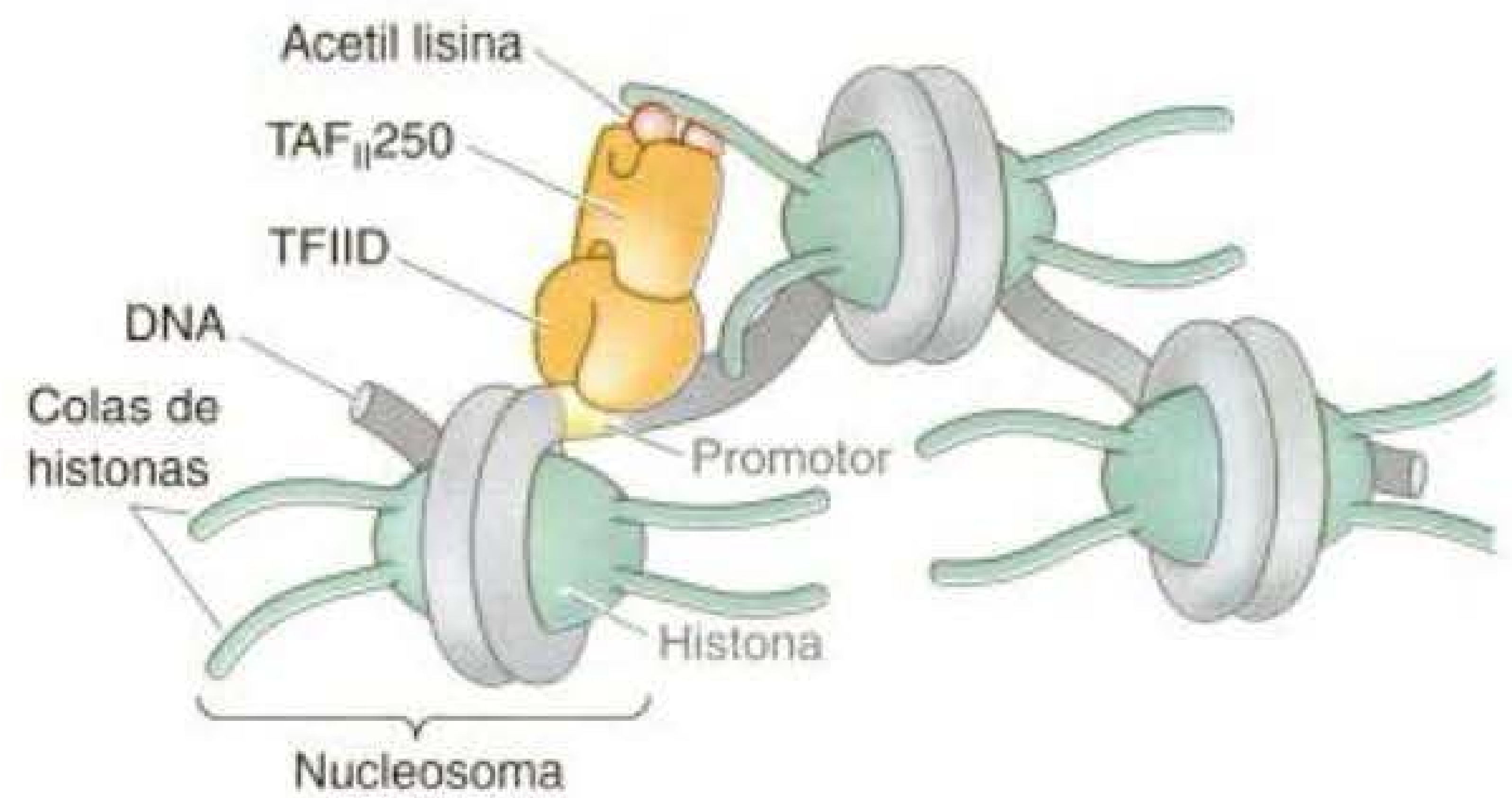


Fig. 5-10. TAF$_{II}$250, una TAF que une TBP, puede funcionar como una histona acetiltransferasa. Por lo tanto, ésta puede acetilar histonas y de este modo alterar a los nucleosomas. Además puede unir residuos de lisina acetilados sobre las histonas y ser capaz de posicionar al TBP sobre el promotor. Estas capacidades se relacionan con su función como se propone en la figura 5-5, donde el TBP es parte del complejo TFIID. (Según Pennisi 2000.)

PAX6. El factor de transcripción Pax6, que es necesario para el desarrollo del ojo de mamíferos, del sistema nervioso y del páncreas, contiene dos potenciales dominios de unión al DNA. Su principal dominio de unión reside en su extremo aminoterminal; los aminoácidos de este dominio interactúan con una secuencia específica de 20-26 pares de bases de DNA (fig. 5-11; Xu y col. 1995). Tales secuencias de unión para Pax6 han sido encontradas en los potenciadores de los genes cristalina del cristalino de vertebrados y en los genes expresados en las células endocrinas del páncreas (aquellas que liberan insulina, glucagón y somatostatina) (Cvekl y Piatigorsky 1996; Andersen 1999). Cuando Pax6 se une a un potenciador de un gen o a un promotor, ésta puede activar o reprimir el gen. El dominio de activación-*trans* de Pax6 es rico en prolina, treonina y serina. Las mutaciones en esta región provocan severas anomalías en el sistema nervioso, pancreáticas y ópticas en seres humanos (Glaser y col. 1994).

El uso de Pax6 por diferentes órganos demuestra la manera combinatoria mediante la cual funcionan los factores de transcripción. La figura 5-12 muestra dos regiones reguladoras de genes que unen Pax6. La primera es aquella del gen de cristalina del cristalino δ1 de pollo (Cvekl y Piatigorsky, 1996; Muta y col. 2002). Este gen tiene un promotor que contiene un sitio de unión para TBP y un elemento promotor corriente arriba que une Sp1 (un activador transcripcional general encontrado en todas las células). El gen también tiene un potenciador en su tercer intrón que controla el tiempo y lugar de expresión del gen cristalina. Este potenciador tiene dos sitios de unión de Pax6. El gen de cristalina no será expresado

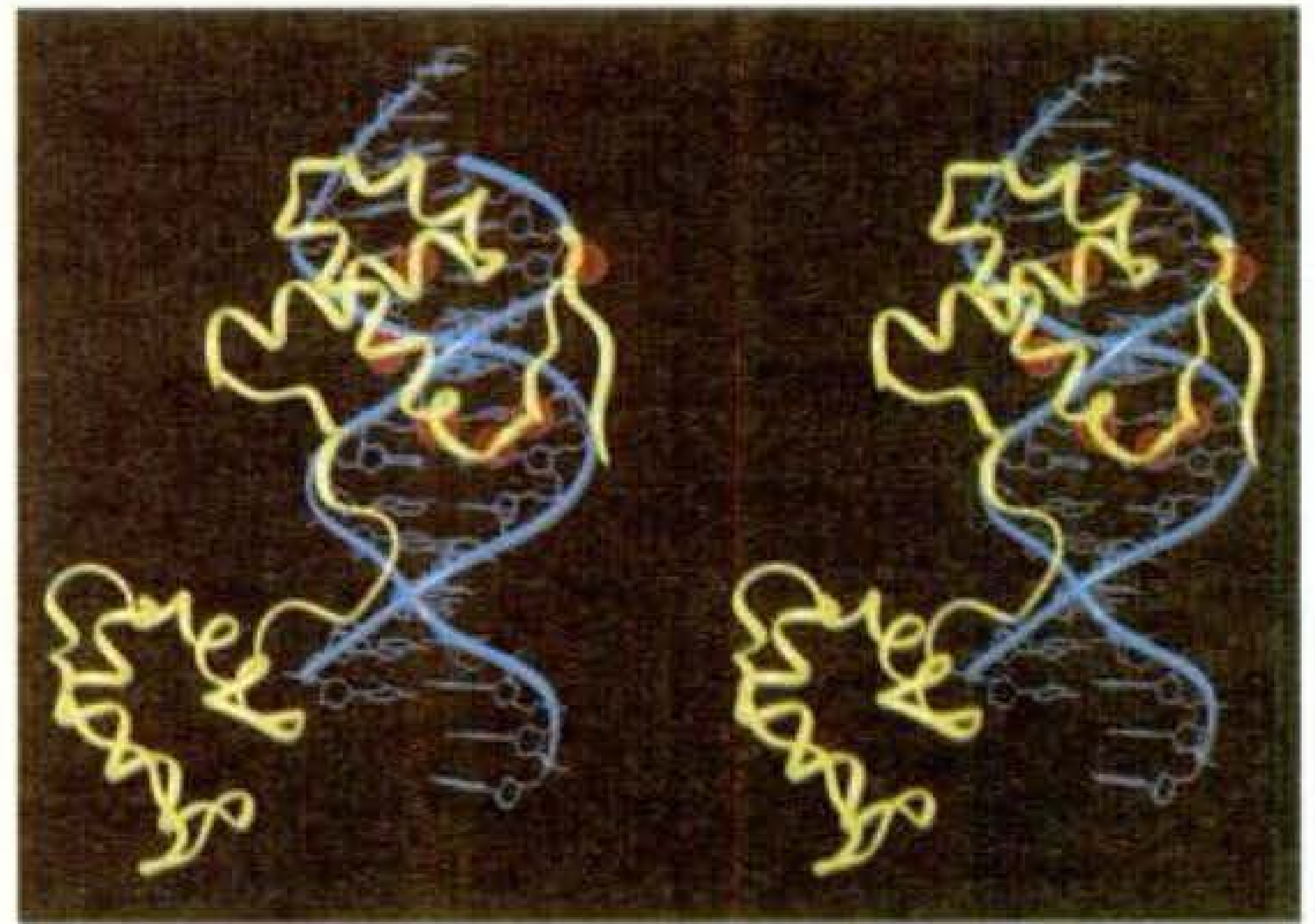


Fig. 5-11. Modelo estereoscópico de la proteína Pax6 uniéndose a su elemento potenciador en el DNA. La región de unión al DNA de Pax6 se muestra en amarillo; el DNA de doble hélice es azul. Los puntos rojos indican los sitios de mutaciones de pérdida de función en el gen *Pax6* que dan origen a proteínas Pax6 no funcionales. Vale la pena tratar de cruzar los ojos para conseguir la figura central tridimensional. (De Xu y col. 1995; fotografía cortesía de S. O. Pääbo.)

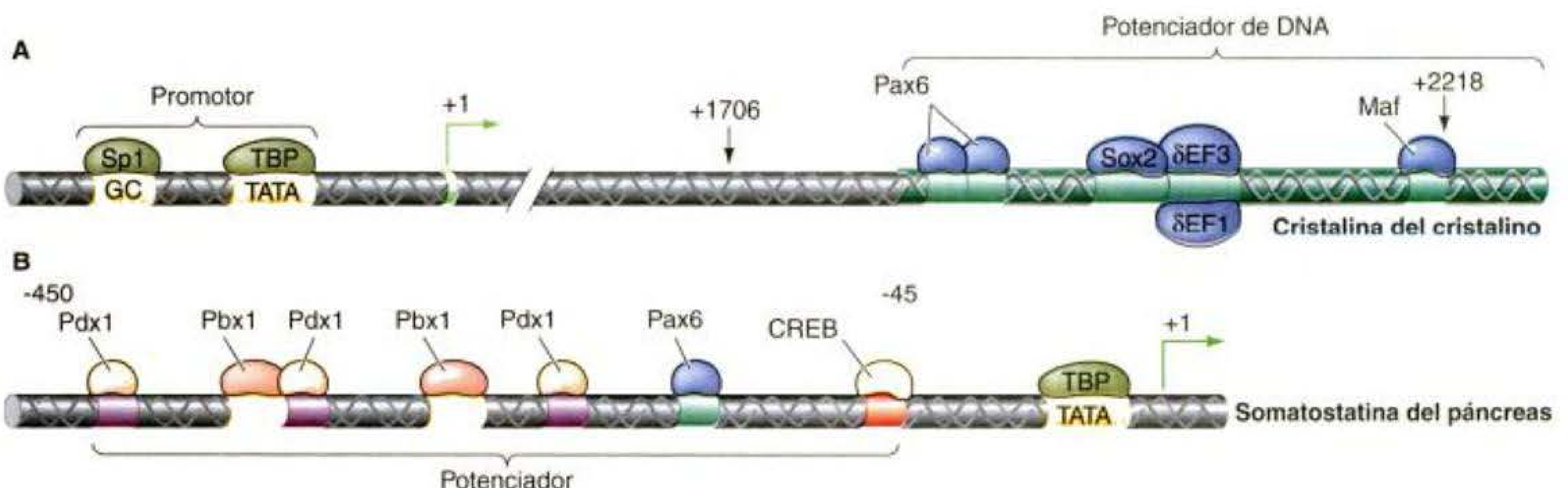


Fig. 5-12. Las regiones reguladoras transcripcionales modulares utilizan Pax6 como un activador. **A.** Promotor y potenciador del gen cristalina d1 del cristalino de pollo. Pax6 interactúa con otros dos factores de transcripción, Sox2 y Maf, para activar este gen. **B.** Promotor y potenciador del gen de la somatostatina de rata. Pax6 activa este gen mediante la cooperación con el factor de transcripción Pdx1. (**A**, según Cvekl y Piatigorsky 1996; **B**, según Andersen y col. 1999.)

a menos que Pax6 esté presente en el núcleo y se una a sus sitios potenciadores. Como se mencionó en el capítulo 4, Pax6 se encuentra presente durante el desarrollo temprano en el sistema nervioso y en el ectodermo superficial de la cabeza del pollo. Además, este potenciador tiene un sitio de unión para otro factor de transcripción, la proteína Sox2. Sox2 no es encontrada frecuentemente en el ectodermo superficial, sino que ésta aparece en aquellas células ectodérmicas superficiales que llegarán a convertirse en cristalino en virtud de haber sido inducidas por la vesícula óptica en proceso de evaginación desde el cerebro (Kamachi y col. 1998). De este modo, solo aquellas células que contienen Sox2 y Pax6 pueden expresar el gen de cristalina del cristalino. Además, un *tercer* sitio sobre el potenciador puede unirse a un activador (la proteína dEF3) o a un represor (la proteína dEF1) de la transcripción. Se piensa que el represor puede ser crítico en prevenir la expresión de cristalina en el sistema nervioso. De este modo, los potenciadores funcionan de una manera combinatoria, en la que varios factores de transcripción trabajan juntos para promover o inhibir la transcripción.

Otro grupo de regiones reguladoras que utilizan Pax6 son los potenciadores que regulan la transcripción de los genes de la insulina, glucagón, y somatostatina en el páncreas (fig. 5-12B). Aquí, Pax6 es esencial para la expresión del gen, y funciona en cooperación con otros factores de transcripción como Pdx1 (específico para la región pancreática del endodermo) y Pbx1 (Andersen y col. 1999; Hussain y Habener 1999). Ante la ausencia de Pax6 (como en la mutación homocigota ojo pequeño [*small eye*] en ratones y ratas), las células endocrinas del páncreas no se desarrollan apropiadamente, y la producción de hormonas por aquellas células es deficiente (Sander y col. 1997). Se puede ver que los genes para proteínas específicas utilizan numerosos factores de transcripción en varias combinaciones. De este modo, los potenciadores son modulares (tanto que el gen Pax6 es expresado en el ojo, páncreas y sistema nervioso, como se muestra en la figura 5-7); pero dentro de estos módulos, los factores de transcripción funcionan en un manera combinatoria (tanto que en algunas células Pax6 ayuda a activar a los genes de cristalina pero en otras células Pax6 ayuda a transcribir a los genes de insulina). En este sentido, los factores de transcripción pueden regular el tiempo y el lugar de expresión del gen.

Hay otros genes que son activados por la unión de Pax6, y uno de ellos es el mismo gen *Pax6*. La proteína Pax6 puede unirse al promotor del gen *Pax6* (Plaza y col. 1993). Esto significa que una vez que el gen *Pax6* es encendido, seguirá siendo expresado, incluso si la señal que originalmente lo activó no perdura mucho tiempo.

Dentro de la década pasada, el conocimiento sobre los factores de transcripción ha progresado enormemente, dando una nueva visión dinámica de la expresión del gen. El gen en sí mismo no es considerado más como una entidad independiente que controla la síntesis de proteínas. En su lugar, el gen dirige y es dirigido por la síntesis de proteínas. Natalie Angier (1992) ha escrito, "Una serie de nuevos descubrimientos sugieren que el DNA se parece más a un cierto tipo de políticos, rodeado por una multitud de los tratantes de las proteínas y de los consejeros que deben darle masajes vigorosamente, retorcerlo y, de vez en cuando volver a inventarlo antes de que el espléndido programa del cuerpo pueda no tener sentido en todos".

Cascadas de los factores de transcripción

Ahora se conoce que la expresión tejido-específica de un gen particular es el resultado de la presencia de una particular constelación de factores de transcripción en el núcleo de la célula. Es importante ver que sus modos combinatorios de operación indican que ninguno de estos factores de transcripción debe ser tejido-específico.

Pero ¿cómo hacen los factores de transcripción para llegar a ser expresados de una forma tejido específica? En muchos casos, los genes para los factores de transcripción son activados por otros factores de transcripción. Por ejemplo, el gen para Pax6, que es un factor de transcripción, es regulado (en la cabeza anterior) por el factor de transcripción Mbx que llega a ser expresado al final de la gastrulación (Kawahara y col. 2002). En otros casos (como se verá en el caso de MITF), el factor de transcripción está presente, pero debe ser activado mediante señales proporcionadas por la inducción. Esto será discutido con mayor profundidad en el siguiente capítulo.

Wilhelm Roux (1894) describió esta situación elocuentemente en su manifiesto para la embriología experimental cuando sostuvo que el análisis causal del desarrollo puede ser el mayor problema que el intelecto humano ha intentado resolver, "debido a que cada nueva causa establecida solo da origen a preguntas frescas con respecto a la causa de esta causa."

Información adicional y especulaciones

Estudio de los elementos reguladores del DNA

Identificación de los elementos reguladores del DNA

¿Cómo se puede saber que un fragmento particular de DNA se une a un factor de transcripción particular? Uno de los caminos más simples es realizar un **análisis del cambio de la movilidad del gel**. La base para este análisis es el gel de electroforesis. Recordar del capítulo 4 que los fragmentos de DNA pueden ser colocados en una depresión en un extremo de un gel y correr una corriente eléctrica a través del gel. Los fragmentos se moverán hacia el polo negativo, y la distancia que viaja cada fragmento en un determinado tiempo dependerá de su masa y de su conformación. Los fragmentos más grandes correrán más lentamente que los fragmentos más pequeños. Si los fragmentos de interés son incubados en una solución de la proteína Pax6 antes de ser colocados en el gel,

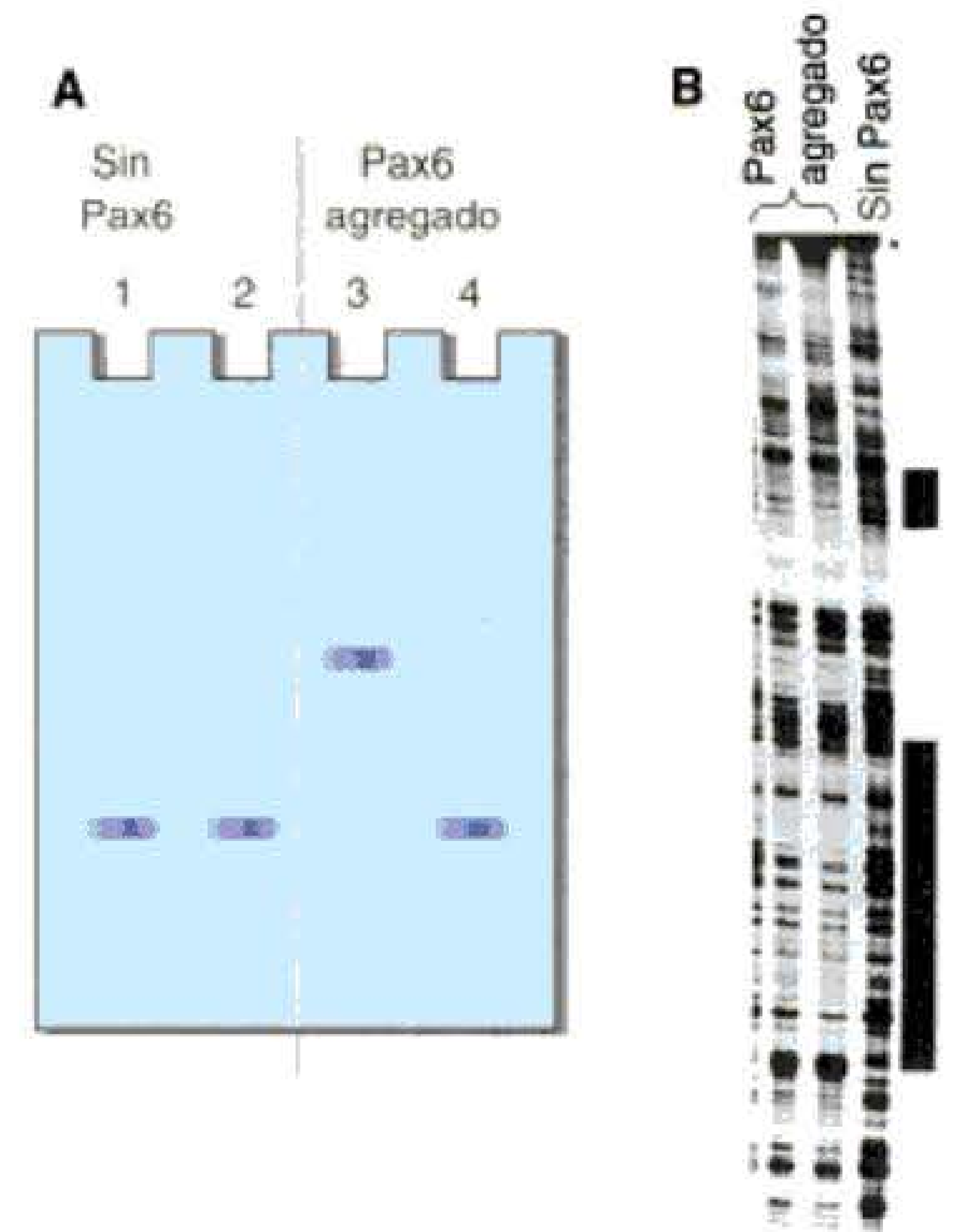


Fig. 5-13. Procedimientos para determinar los sitios de unión al DNA de los factores de transcripción. **A.** Ensayo de cambio de la movilidad del gel. Un fragmento de DNA que contiene el sitio de unión de Pax6 cambia su movilidad en el gel cuando la proteína Pax6 se une a éste. Las calles 1 y 3 muestran las posiciones de los fragmentos de DNA que contienen el sitio de unión a Pax6. Cuando Pax6 es agregado al fragmento, este se mueve más lentamente. Las calles 2 y 4 muestran las posiciones de un fragmento de tamaño similar que no une Pax6. **B.** Un ensayo de protección de DNasa del intrón entre el tercer y cuarto exón del gen cristalina δ1 del cristalino de pollo. El DNA con Pax6 y sin ella es marcado en un extremo y es sujeto a variaciones en las concentraciones de DNasa I, que segmenta azarosamente al DNA. Los fragmentos resultantes son corridos sobre un gel electroforético y radioautografiados. No se observa segmentación en la región donde una proteína unida (Pax6) ha impedido la unión de la DNasa. Hay dos sitios (las barras densas) donde la unión de Pax6 es capaz de proteger el DNA de la digestión con DNasa; estos sitios son los potenciadores. (**A**, según Beimesche y col. 1999; **B**, de Cvekl y col. 1995.)

una de dos cosas podría suceder. Si Pax6 no reconoce ninguna secuencia en un fragmento de DNA, el DNA no se unirá y el fragmento migrará a través del gel como normalmente lo haría. Alternativamente, si la proteína Pax6 reconoce una secuencia en el DNA, se unirá a éste, incrementando la masa del fragmento y provocando que éste corra más lentamente a través del gel. La figura 5-13A muestra el uso de tal gel para localizar el sitio de unión de la proteína Pax6.

Los resultados de este procedimiento son a menudo confirmados mediante un **ensayo de protección de DNasa.** Si una proteína unida al DNA como Pax6 encuentra su secuencia de interés en un fragmento de DNA, se unirá a éste. Si el fragmento es luego colocado en una solución de DNasa I (una enzima que segmenta al DNA azarosamente), el factor de transcripción unido protegerá a esta región específica del DNA de ser segmentada. La figura 5-13B muestra el resultado de uno de estos ensayos para la unión de Pax6.

Los genes reporteros, como el gen *lacZ* mencionado antes, son también utilizados para determinar las funciones de varios fragmentos de DNA. Si se piensa que una secuencia de DNA contiene un potenciador, ésta puede ser fusionada con un gen reportero e inyectada en una célula huevo o cigoto por varios medios. Si la secuencia analizada es capaz de dirigir la expresión del gen reportero en los tejidos apropiados, se asume que ésta contiene un potenciador.

Uno de los conceptos de interés que emerge a partir de este trabajo es que los factores de transcripción involucrados en el mecanismo de la diferenciación celular en una región determinada son a menudo utilizados para especificar esta región como un cierto tipo de tejido. Por lo tanto, el factor de transcripción Pax6 es utilizado en la especificación de la región formadora del ojo así como en la diferenciación de la retina, y el factor de transcripción Pdx es utilizado en la especificación del rudimento pancreático y en la activación posterior de los genes para insulina y de somatostatina derivados a partir del tejido (véase Hui y Perfetti 2002).

Knockouts condicionales: ratones floxed

Un uso experimental críticamente importante de los potenciadores ha sido la eliminación condicional de la expresión de un gen en ciertos tipos celulares. Por ejemplo, el factor de transcripción Hnf4α es expresado en las células del hígado. Este factor es similar a una proteína que une hormonas, y podría ser importante en la transcripción de ciertas proteínas hepáticas. Pero si el gen es eliminado de los embriones de ratón, los embriones mueren antes de que ellos incluso formen un hígado. Esto es debido a que Hnf4α es crítico en la formación del endodermo visceral del saco vitelino; si este tejido no se forma correctamente, el animal muere muy temprano en el desarrollo. Tanto es así que se necesita crear una mutación que será *condicional* –esto es, una mutación que aparecerá solamente en el hígado y en ningún otro lado más. ¿Cómo se puede hacer esto?

La técnica **Cre-Lox** utiliza recombinación homóloga (véase cap. 4) para colocar dos sitios de reconocimiento (secuencias *loxP*) de Cre-recombinasa dentro del gen de interés, usualmente flanqueando importantes exones (véase Kwan 2002). Tal gen se dice que esta "floxed" ("*loxP*-flanqueado"). Por ejemplo, utilizando cultivos de células madre de ratón, Parvis y col. (2002) colocaron dos secuencias *loxP* alrededor del segundo exón del gen de ratón *Hnf4α* (fig. 5-14). Estas células madre luego fueron utilizadas para generar ratones que tenían estos alelos floxed. Se generó una segunda cepa de ratones que contenía un gen codificando al bacteriófago Cre-recombinasa (la enzima que reconoce la secuencia *loxP*) unido al promotor de un gen de albúmina que es expresado muy temprano en el desarrollo del hígado. Por lo tanto, durante el desarrollo del ratón, Cre-recombinasa sería producida solo en las células hepáticas. Cuando las dos cepas de ratón fueron cruzadas, algunos de sus recién nacidos portaban ambas adiciones. En estos ratones doblemente marcados, Cre-recombinasa se une a sus sitios de reconocimiento –las secuencias *loxP*– flanqueando al segundo exón de los genes *Hnf4α*. Ésta luego actúa como una recombinasa y elimina este segundo exón. El DNA obtenido codifica una proteína no funcional, debido a que el segundo exón tiene una función crítica en *Hnf4α*. Por lo tanto, el gen *Hnf4α* fue "noqueado" únicamente en las células hepáticas.

SITIO WEB 5.6 **Otros métodos de recombinasa (Other recombinase methods).** El sistemas Cre-Lox está patentado, y se espera que cada investigador que lo utilice pague la patente a su dueño. Esto ha provocado una gran preocupación legal sobre si tales procedimientos deberían ser de propiedad privada. Esto también ha desencadenado la búsqueda de otros caminos para producir mutantes condicionales.



Fig. 5-14. La técnica Cre-lox para mutagénesis condicional, por la que las mutaciones de un gen pueden ser generadas únicamente en células específicas. Los ratones son producidos de modo que los alelos tipo salvaje (en este caso, los genes codificadores del factor de transcripción Hnf4a) han sido reemplazados por alelos en los que el segundo exón es flanqueado por secuencias *lox*P. Estos ratones son apareados con ratones que tienen el gen para Cre-recombinasa transferido a un promotor que es activo solo en células particulares. En este caso, el promotor es el de un gen de albúmina que funciona temprano en el hígado en desarrollo. En ratones con ambos de estos alelos alterados, Cre-recombinasa es producida solo en las células donde el promotor fue activado (es decir, en las células que sintetizan albúmina). Cre-recombinasa se une a las secuencias *lox*P que flanquean los exones y elimina a esos exones. Por lo tanto, en el caso aquí representado, solo las células del hígado en desarrollo pierden un gen *Hnf4α* funcional.

Trampa de potenciadores: estar en el lugar correcto en el momento correcto

La capacidad de un potenciador de un gen para activar a otros genes ha sido utilizada por los científicos para encontrar nuevos potenciadores y los genes regulados por ellos. Para hacerlo, se produce una **trampa de potenciadores**, que consiste de un gen reportero (como el gen *lacZ* de *E. coli* o el gen GFP de medusa) fusionado a un promotor relativamente débil. Este promotor relativamente débil no iniciará la transcripción del gen reportero sin la ayuda de un potenciador. Esta trampa de potenciador recombinante es luego introducida en una célula huevo o en el ovocito, donde esta se integra azarosamente al genoma. Si el gen reportero es expresado, significa que el reportero ha caído dentro del dominio de un potenciador activo (fig. 5-15). Mediante el aislamiento de esta región activada del genoma en las

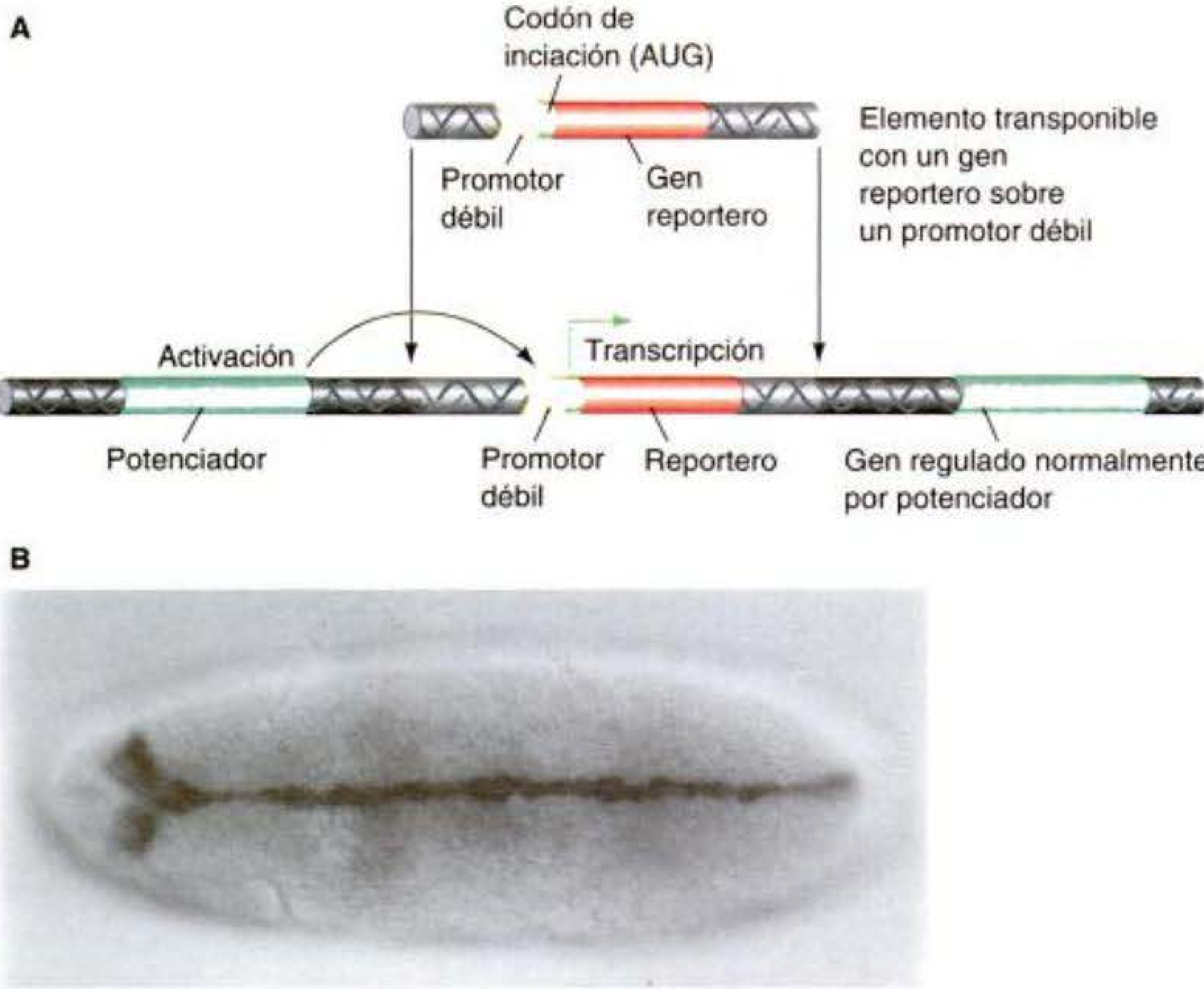


Fig. 5-15. Técnica de trampa de potenciadores. **A.** Un gen reportero es fusionado a un promotor débil que no puede dirigir la transcripción por sí mismo. Este gen recombinante es inyectado en el núcleo de un ovocito y se integra azarosamente al genoma. Si se integra cerca de un potenciador, el gen reportero será expresado cuando el potenciador se activa, mostrando el patrón de expresión normal de un gen normalmente asociado con este potenciador. **B.** Expresión del gen reportero (región oscura) en un embrión de *Drosophila* inyectado con una trampa de potenciador. Este patrón de expresión demostró la presencia de un potenciador que es activo en el desarrollo del sistema nervioso del insecto y que no fue reconocido antes del procedimiento. (Fotografía cortesía de Y. Hiromi.)

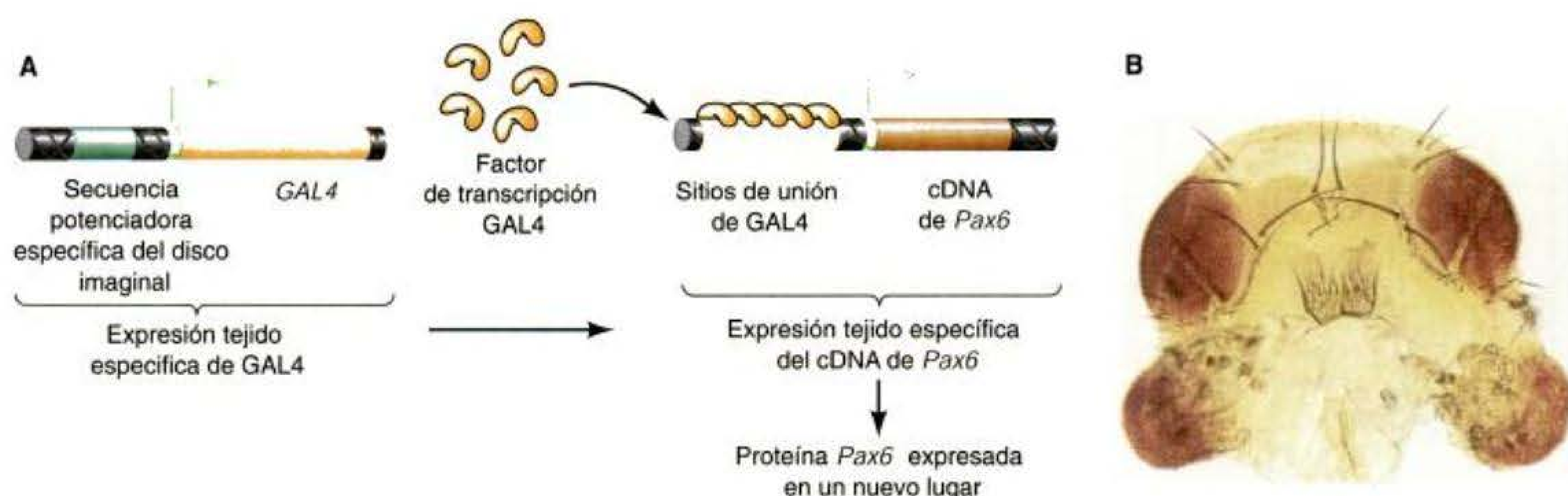


Fig. 5-16. Expresión dirigida del gen *Pax6* en un disco imaginal sin ojo de *Drosophila*. **A.** Se construyó una estirpe de *Drosophila* en la que el gen para el factor de transcripción GAL4 de levadura fue colocado corriente abajo de una secuencia potenciadora que normalmente estimula la expresión del gen en los discos imaginales para las partes de la boca. Si el embrión también contiene un transgén que coloca los sitios de unión de GAL4 corriente arriba del DNA del gen de *Pax6*, el gen *Pax6* será expresado en cualquier disco imaginal en el que sea producida la proteína GAL4. **B.** Los ommatidios de la *Drosophila* (ojo compuesto) surgen a partir de las partes de la boca de la mosca de la fruta en las que el gen *Pax6* fue expresado en los discos labiales (mandíbula). (Fotografía cortesía de W. Gehring y G. Halder.)

moscas o ratones tipo salvaje, puede ser descubierto el gen normal que es activado por un potenciador (O'Kane y Gehring 1987).

Activación de genes en todos los lugares erróneos: activación de GAL4

Uno de los usos más poderosos de esta tecnología genética ha sido para *activar genes reguladores como Pax6 en nuevos lugares*. Utilizando embriones de *Drosophila*, Halder y col. (1995) en el laboratorio de Walter Gehring colocaron un gen codificando la proteína activadora transcripcional GAL4 de levadura corriente abajo de un potenciador del cual se conoce su función en los discos imaginales labiales (aquellas partes de la larva de *Drosophila* que llegan a ser las partes de la boca del adulto). En otras palabras, el gen para el factor de transcripción GAL4 fue puesto próximo a un potenciador para genes normalmente expresados en el desarrollo de la mandíbula. Por lo tanto, GAL4 debe expresarse también en el tejido mandibular. Halder y col. construyeron a continuación una segunda mosca transgénica, colocando el cDNA para el gen *Pax6* de *Drosophila* corriente abajo de una secuencia compuesta de cinco sitios de unión a GAL4. La proteína GAL4 se debía producir solamente en un grupo particular de células destinadas a convertirse en la mandíbula, y cuando esta proteína era producida, debía causar la transcripción del gen *Pax6* en aquellas células particulares (fig. 5-16A). En moscas en las que el gen *Pax6* fue expresado en las células de la mandíbula incipiente, parte de la mandíbula dio origen a ojos (fig. 5-16B). Pax6 en *Drosophila* y en ranas (pero no en ratones) es capaz de transformar varios tipos de tejido en desarrollo en ojos (Chou y col. 1999). Parece ser que en *Drosophila*, Pax6 no solo activa a aquellos genes que son necesarios para la construcción de los ojos, sino que también reprime a aquellos genes que son utilizados para construir a otros órganos.

SITIO WEB 5.7 **Potenciadores y cánceres (Enhacers and cancers).** El atrapamiento de un potenciador puede producirse accidentalmente durante el desarrollo y coloca a un nuevo gen cerca de un elemento regulatorio particular. Cuando los genes de factores de crecimiento son colocados próximos a los genes involucrados en la producción de anticuerpos, el resultado son las leucemias.

Silenciadores

Los silenciadores son elementos reguladores del DNA que reprimen activamente la transcripción de un gen en particular. Ellos pueden ser vistos como "potenciadores negativos." Por ejemplo, en el ratón, hay una secuencia que impide la activación de un promotor en cualquier tejido excepto en las neuronas. Esta secuencia, recibe el nombre de **elemento silenciador restrictivo neural (NRSE** del inglés *neural restrictive silencer element*), ha sido hallada en varios genes de ratón cuya expresión está limitada al sistema nervioso: aquellos que codifican sinapsina I, canal de sodio tipo II, factor neurotrófico derivado del cerebro, Ng-CAM (CAM: molécula de adhesión celular) y L1. La proteína que se une al NRSE es un factor de transcripción dedo de cinc denominado factor silenciador restrictivo neural (NRSF del inglés *neural restrictive silencer factor*). El NRSF aparece expresado en toda aquella célula que *no* es una neurona madura (Chong y col. 1995, Schoenherr y Anderson 1995).

Para poner a prueba la hipótesis que el NRSE es necesario en la represión normal de los genes neurales en células no neurales, se hicieron transgenes mediante la fusión del gen *lacZ* con parte del gen de adhesión celular neural *L1*. (L1 es una proteína cuya función es crítica para el desarrollo del cerebro, como se verá en capítulos posteriores.) En un caso, el gen *L1*, de su promotor a través del cuarto exón, fue fusionado a la secuencia *lacZ*. Un segundo transgén fue hecho como el primero, excepto que en el NRSE había sido eliminado del promotor de L1.

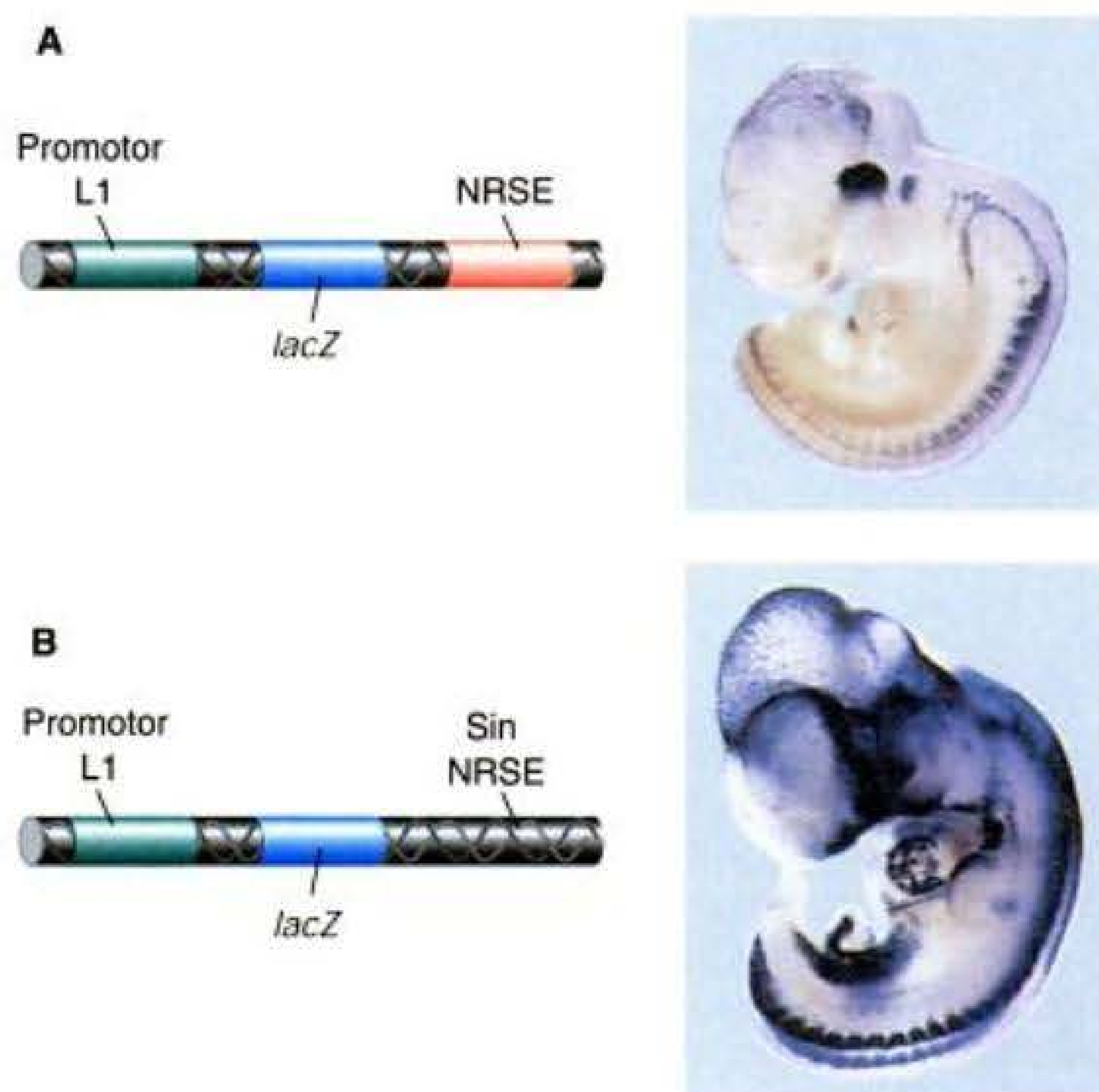


Fig. 5-17. Silenciadores. Análisis de los patrones de tinción de β-galactosidasa en embriones de ratón de 11,5 días. **A.** Embrión que contiene un transgén compuesto del promotor *L1* una porción del gen *L1*, y un gen *lacZ* fusionado al segundo exón (que contiene la región NRSE). **B.** Embrión que contiene un transgén similar, pero carente de la secuencia NRSE. Las áreas oscuras revelan la presencia de β-galactosidasa (el producto de *lacZ*). (De Kallunki y col. 1997.)

Los dos transgenes fueron insertados separadamente en los pronúcleos de los ovocitos fecundados, y los ratones transgénicos resultantes fueron analizados mediante la expresión de β-galactosidasa (Kallunki y col. 1995, 1997). En los embriones que recibieron el transgén completo (que incluyó al NRSE), la expresión fue vista únicamente en el sistema nervioso (fig. 5-17A). Sin embargo, en aquellos ratones cuyos transgenes carecen de NRSE, la expresión fue vista en el corazón, en el mesénquima de los miembros y en el ectodermo de los miembros, en el mesodermo renal, en la pared corporal ventral y en el mesénquima cefálico (fig. 5-17B).

La actividad represiva del NRSF funciona mediante la unión del NRSF con el DNA de una **histona deacetilasa**. Precisamente cuando la histona acetiltransferasa libera nucleosomas, la histona deacetilasa los estabilizan. Esto impide que el promotor sea reconocido (Roopra y col. 2000; Jepson y col. 2000).

> SITIO WEB 5-8 **Mecanismos adicionales de la regulación transcripcional (Further mechanisms of transcriptional regulation).** Estos tres sitios web cubren 1) hipersensibilidad de la DNasa I, 2) regiones control de locus y los mecanismos por los cuales los LCR pueden regular la expresión temporal de los genes relacionados y 3) la asociación de los genes activos con la matriz nuclear.

Patrones de metilación y el control de la transcripción

Metilación del DNA y actividad del gen

¿Cómo llega a ser estable un patrón de transcripción de un gen? ¿Cómo puede una célula del cristalino continuar siendo una célula del cristalino y no activar genes específicos de músculo? ¿Cómo pueden las células experimentar rondas de mitosis y todavía mantener sus características diferenciadas? Las respuestas parecen estar en la **metilación del DNA**. Los promotores de los genes inactivos llegan a ser metilados en ciertos residuos de citosina, y la metilcitosina obtenida estabiliza a los nucleosomas y evita la unión de los factores de transcripción.

Se asume con frecuencia que un gen contiene exactamente los mismos nucleótidos si está activo o inactivo; esto es, un gen de la β-globina en un precursor de glóbulo rojo tiene los mismos nucleótidos que un gen de β-globina en un fibroblasto o célula de la retina del mismo animal. Hay, sin embargo, una sutil diferencia en el DNA. En 1948, R. D. Hotchkiss descubrió una "quinta base" en el DNA, 5-metilcitosina. En vertebrados, esta base es producida enzimáticamente después de la replicación del DNA. En este momento, cerca del 5% de las citosinas del DNA de mamíferos son convertidas a 5-metilcitosina (fig. 5-18A). Esta conversión puede producirse únicamente cuando el residuo de citosina es seguido por una guanosina. Estudios recientes han demostrado que el grado de metilación de las citosinas de un gen puede controlar el nivel de transcripción del gen. La metilación de citosinas parece ser el principal

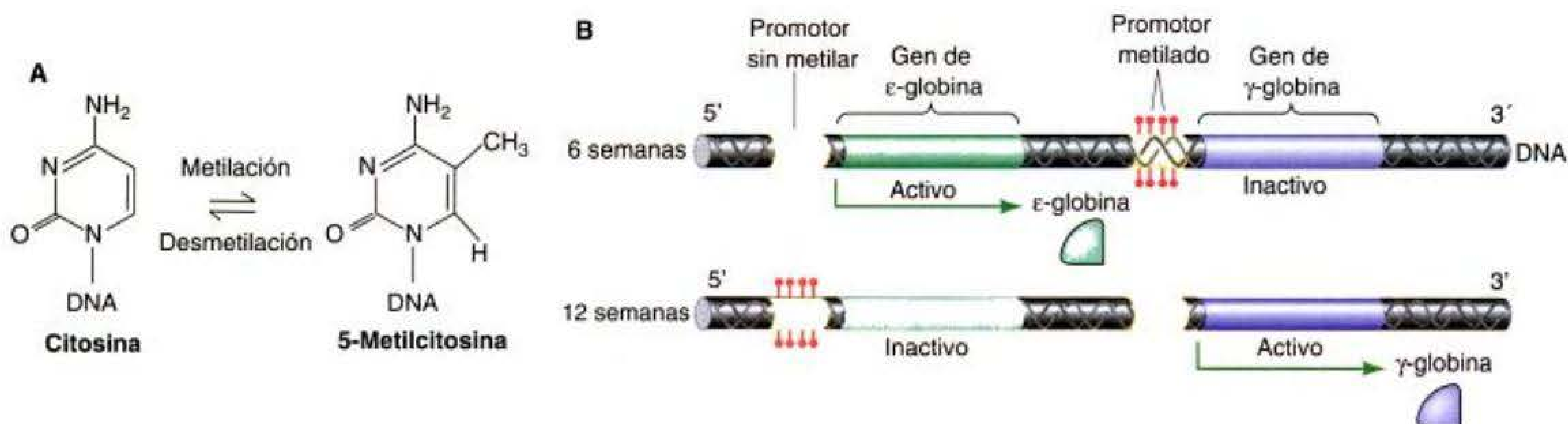


Fig. 5-18. Metilación de los genes de la globina en las células sanguíneas embrionarias humanas. **A.** Estructura de 5-metilcitosina. **B.** La actividad de los genes de β-globina humana se correlaciona inversamente con la metilación de sus promotores. (Según Mavilio y col. 1983.)

mecanismo de regulación transcripcional en vertebrados; sin embargo, *Drosophila*, nematodos, y tal vez la mayoría de los invertebrados no metilan su DNA.

En vertebrados, la presencia de citosinas metiladas en el promotor de un gen se correlaciona con la represión de la transcripción de este gen. En los glóbulos rojos del ser humano y del pollo en desarrollo, el DNA de los promotores del gen de la globina está casi por completo sin metilar, mientras que los mismos promotores están altamente metilados en células que no producen globina. Además, los patrones de metilación cambian durante el desarrollo (fig. 5-18B). Las células que producen hemoglobina en el embrión humano tienen promotores no metilados en los genes que codifican ε-globinas ("cadenas de globina embrionarias") de hemoglobina embrionaria. Estos promotores se convierten en metilados en el tejido fetal, cuando los genes para la γ-globina fetal-específica (en lugar de las cadenas embrionarias) llegan a ser activados (van der Ploeg y Flavell 1980; Groudine y Weintraub 1981; Mavilio y col. 1983). Del mismo modo, cuando la globina fetal le deja el lugar a la (β) globina del adulto, los promotores de los genes de la γ-globina de la globina fetal se metilan.

La correlación entre citosinas metiladas y represión transcripcional ha sido confirmada de manera experimental. Mediante el agregado a las células de transgenes con diferentes patrones de metilación, Busslinger y col. (1983) demostraron que la metilación en el promotor o en el potenciador de un gen se correlaciona extremadamente bien con la represión de la transcripción de un gen. En los vertebrados en desarrollo, la ausencia de metilación de DNA se correlaciona estrechamente con la expresión tejido-específica de muchos genes.

Modificación de la cromatina

¿Cómo son metilados algunos genes? y ¿cómo logra esta metilación impedir la expresión del gen? Una propuesta es que hay una interacción recíproca entre las histonas en la cromatina y el DNA que las rodea. Parece haber una competición para la modificación del residuo lisina sobre la novena posición de la histona H3. Si este sitio es acetilado, la histona se desestabiliza y puede causar la dispersión del nucleosoma. Si este sitio no es acetilado, puede ser metilado. La metilación de esta histona incrementa la estabilidad del nucleosoma, impidiendo su disociación o movimiento. Tanto es así que la modificación de la cola de la histona H3 puede actuar como un "interruptor" entre el estado activado (nuclesoma dispersado) e inactivado (nucleosoma estable) de un gen. La histona metilada puede ser capaz de reclutar de su vecindad las enzimas que metilan el DNA (Rea y col. 2000; Tamaru y Selker 2001). Una vez que el DNA es metilado, éste puede estabilizar al nucleosoma aún más.

Una proteína denominada MeCP2 se une selectivamente a las regiones de DNA metiladas; ésta también se une a la histona deacetilasa. De este modo, cuando MeCP2 se une al DNA metilado puede estabilizar a los nucleosomas en esta región particular de la cromatina (Keshet y col. 1986; Jones y col. 1998; Nan y col. 1998). El DNA metilado puede también unirse preferencialmente por la histona H1, la histona que asocia a los nucleosomas en complejos plegados de un orden mayor (McArthur y Thomas 1996). De esta manera, un estado inactivo puede ser propagado a lo largo del DNA. Los factores de transcripción pueden actuar para impedir el plegado en un orden mayor o para liberar a los nucleosomas mediante la desmetilación y la acetilación de las histonas, permitiendo de este modo al DNA convertirse en no metilado y a los promotores llegar a ser accesibles.

Los grupos metilo que distinguen a los genes activos de los inactivos son colocados en el DNA durante la diferenciación de los tipos celulares. Las células totipotentes de la masa celular interna, por ejemplo, no tienen grupos metilo sobre los genes tipo-específico de célula tales como aquellos para las globinas. En su lugar, el DNA de estas células tempranas carece de patrones de metilación tejido-específico que caracterizan a las células diferenciadas. (Hay, sin embargo, otros patrones de metilación poco comunes que ellas llevan; véase Información adicional y especulaciones.) Cuando los mamíferos son clonados (véase cap. 4), en realidad se le está pidiendo al citoplasma de la célula huevo que borre o que ignore los patrones de metilación que han sido establecidos en un núcleo celular diferenciado. Ésta es probablemente la razón por la que los trabajos de clonación funcionan menos del 5% de las veces, aun cuando los genes mismos debieran ser normales, y también es la razón por la que los animales clonados que sobreviven tienen a menudo anomalías del desarrollo (Rideout y col. 2001).

Los patrones de metilación de DNA normales de las células diferenciadas son mantenidos durante la división celular por la enzima DNA (citosina-5)-metiltransferasa. Durante la replicación del DNA, una cadena (la cadena molde) retiene su patrón de metilación, mientras que la nueva cadena sintetizada no lo hace. La enzima DNA (citosina-5)-metiltransferasa tiene una fuerte preferencia por el DNA que tiene una cadena metilada, y cuando ésta encuentra un metil-CpG sobre un lado del DNA, metila la nueva C sobre el otro lado (Gruenbaum y col. 1982; Bestor e Ingram 1983).

Aisladores o fronteras génicas (insulators or boundaries)

Los efectos de los potenciadores deben saber dónde detenerse. Debido a que los potenciadores pueden funcionar a distancias relativamente largas, es posible para ellos activar a varios promotores cercanos. Para detener la diseminación del poder de un potenciador, hay secuencias **aisladoras o fronteras génicas** en el DNA (fig. 5-19; Zhao y col. 1995; Bell y col. 2001). Los aisladores unen proteínas que impiden la activación de un promotor adyacente por parte de un potenciador; ellos están a menudo localizados entre el potenciador y el promotor. Por ejemplo, en el pollo, los genes de la familia de la β-globina están flanqueados por aisladores sobre ambos lados. Sobre uno de los lados está un aislador que impide a los potenciadores del gen de la globina activar a los genes de receptores de odorantes (que están activos en las neuronas nasales), y sobre el otro lado se encuentra un aislador que impide que los potenciadores del gen de la globina activen al promotor del gen receptor del folato.

Estos aisladores también impiden que la cromatina condensada de los loci vecinos reprima a los genes de la globina que están transcribiéndose activamente. En los

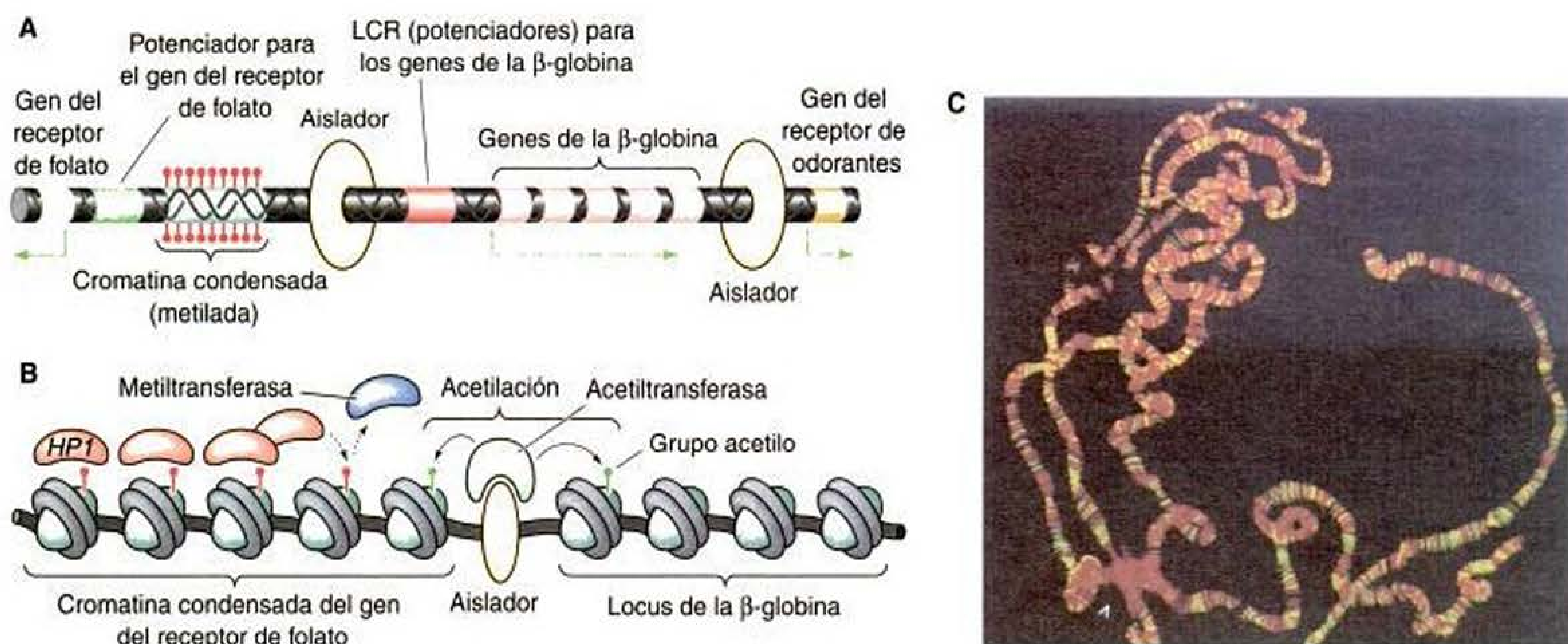


Fig. 5-19. Aisladores o fronteras génicas (Insulators or boundaries). **A.** Los aisladores que flanquean los genes de la β-globina del pollo impiden a los potenciadores de la β-globina una activación del gen del receptor de folato o del gen receptor de odorantes. **B.** En los glóbulos rojos sanguíneos en desarrollo, el gen del receptor del folato es hallado como cromatina altamente condensada, en la que las colas de las histonas H3 están metiladas. Se piensa que el aislador de la β-globina bloquea la extensión de la metilación de histonas mediante el reclutamiento de histonas acetiltransferasas, que evitan la metilación de histonas por las metiltransferasas vecinas. **C.** La proteína BEAF32 se une a cientos de sitios aisladores en el genoma de *Drosophila*. El DNA es teñido de rojo con propidium yodado. El anticuerpo contra BEAF32 tiñe de verde, y la superposición de las señales hace que en el límite el anticuerpo BEAF32 aparezca amarillo. (**B**, según Litt y col. 2001; **C**, fotografía cortesía de U. K. Laemmli.)

precursores de los glóbulos rojos, los genes de la globina son activos, pero el gen adyacente del receptor del folato se encuentra en un estado altamente condensado. Litt y col. (2001) han demostrado que los genes de la globina están en una configuración activa, y que los nucleosomas alrededor del potenciador están altamente acetilados. Los genes del receptor de folato, sin embargo, están fuertemente empaquetados en nucleosomas condensados, con grupos metilo sobre sus colas de histona H3. Se piensa que estos nucleosomas reclutan metiltransferasas que extenderían metilación a más nucleosomas. Sin embargo, el aislador parece reclutar acetiltransferasa que acetila las colas de las histonas y evita la inactivación de la cromatina (fig. 5-19B).

Impronta genómica

En general se supone que los genes que se heredan a partir del padre y los genes que se heredan a partir de la madre son equivalentes. De hecho, la base para las proporciones mendelianas (y los análisis cuadrados de Punnett utilizados para enseñarlas) consideran que no importa si los genes vienen del espermatozoide o del gameto femenino. Pero en mamíferos, hay al menos 30 genes conocidos para los cuales esto *importa*. En estos casos, solamente es expresado el alelo del gen derivado del espermatozoide o solamente el alelo derivado del gameto femenino. Esto significa que una condición severa o letal surge si un alelo mutante es derivado a partir de uno de los padres, pero el mismo alelo mutante no tendrá efectos perjudiciales si es heredado a partir del otro padre. Esto también significa (como se mostrará en el capítulo 7) que los cromosomas maternos y paternos son requeridos para el desarrollo normal de mamíferos.

Por ejemplo, en ratones, el gen para el factor de crecimiento tipo insulina II *(Igf2)* sobre el cromosoma 7 es activo en los embriones tempranos únicamente en el cromosoma transmitido por el padre. Contrariamente, el gen para la proteína que une este factor de crecimiento, *Igf2r*, se localiza sobre el cromosoma 17 y es activo únicamente en el cromosoma transmitido por la madre (Barlow y col. 1991; DeChiara y col. 1991; Bartolomei y Tilghman 1997). La proteína Igf2r une y degrada los excesos de Igf2. Una cría de ratón que hereda la supresión del gen *Igf2r* de su padre es normal, pero si la misma supresión es heredada de la madre, el feto experimenta un 30% de incremento en el crecimiento y muere tardíamente durante la gestación.*

En seres humanos la pérdida de un segmento particular del brazo largo del cromosoma 15 resulta en diferentes

* El aumento en el crecimiento es provocado por un exceso de Igf2. La letalidad es probablemente debida a defectos lisosómicos, debido a que el receptor de Igf2 tiene también como objetivo a las enzimas lisosomales dentro de la organela. En humanos, la inadecuada regulación de la metilación de Igf2 causa el síndrome de crecimiento de Beckwith-Wiedemann.

fenotipos, dependiendo de si la pérdida está en el cromosoma derivado del progenitor masculino o del progenitor femenino (fig. 5-20). Si el cromosoma con el segmento defectuoso o desaparecido viene del padre, el niño nacerá con el síndrome de Prader-Willi, una enfermedad asociada con retraso mental leve, obesidad, gónadas pequeñas y corta estatura. Si el segmento defectuoso viene de la madre, el niño tendrá síndrome de Angelman, caracterizado por retraso mental severo, convulsiones, ausencia de habla y tiene períodos prolongados de risa inmotivada (Knoll y col. 1989; Nicholls y col. 1998).

En tales casos, las diferencias entre los alelos que se expresan y los que no se expresan en general involucran la metilación de residuos de citosina (Arney y col. 2001). En las células germinales primordiales que dan origen al espermatozoide y a los ovocitos, todas las diferencias de metilaciones son eliminadas; el DNA está sin metilar casi en su totalidad (Monk y col. 1987; Driscoll y Migeon 1990). Sin embargo, como la célula germinal se desarrolla en espermatozoide u ovocito, sus genes experimentan una extensa metilación. Además, el patrón de metilación de un gen dado puede diferir entre el espermatozoide y el ovocito. Estas diferencias de metilación específicas de un gen pueden ser vistas en los cromosomas de las células embrionarias (Sanford y col. 1987; Chaillet y col. 1991; Kafri y col. 1992). La metilación de una región potenciadora cerca del gen de ratón Igf2 determina si el gen será o no expresado, y este potenciador es metilado de modo diferente en el espermatozoide y en el ovocito. La expresión de los loci maternos y paternos sobre el cromosoma 15 humano también depende de las diferencias de metilación en regiones específicas sobre este cromosoma (Zeschingk y col. 1997; Ferguson-Smith y Surani 2001). Esta marca de un gen cuando viene del padre o de la madre es denominada **impronta genómica**.

La impronta genómica agrega información al genoma heredado, información que puede regular los patrones espaciales y temporales de la actividad de un gen. Esto también proporciona un recordatorio de que el organismo no puede ser explicado únicamente por sus genes. Se necesita el conocimiento de los parámetros del desarrollo así como de los genéticos.

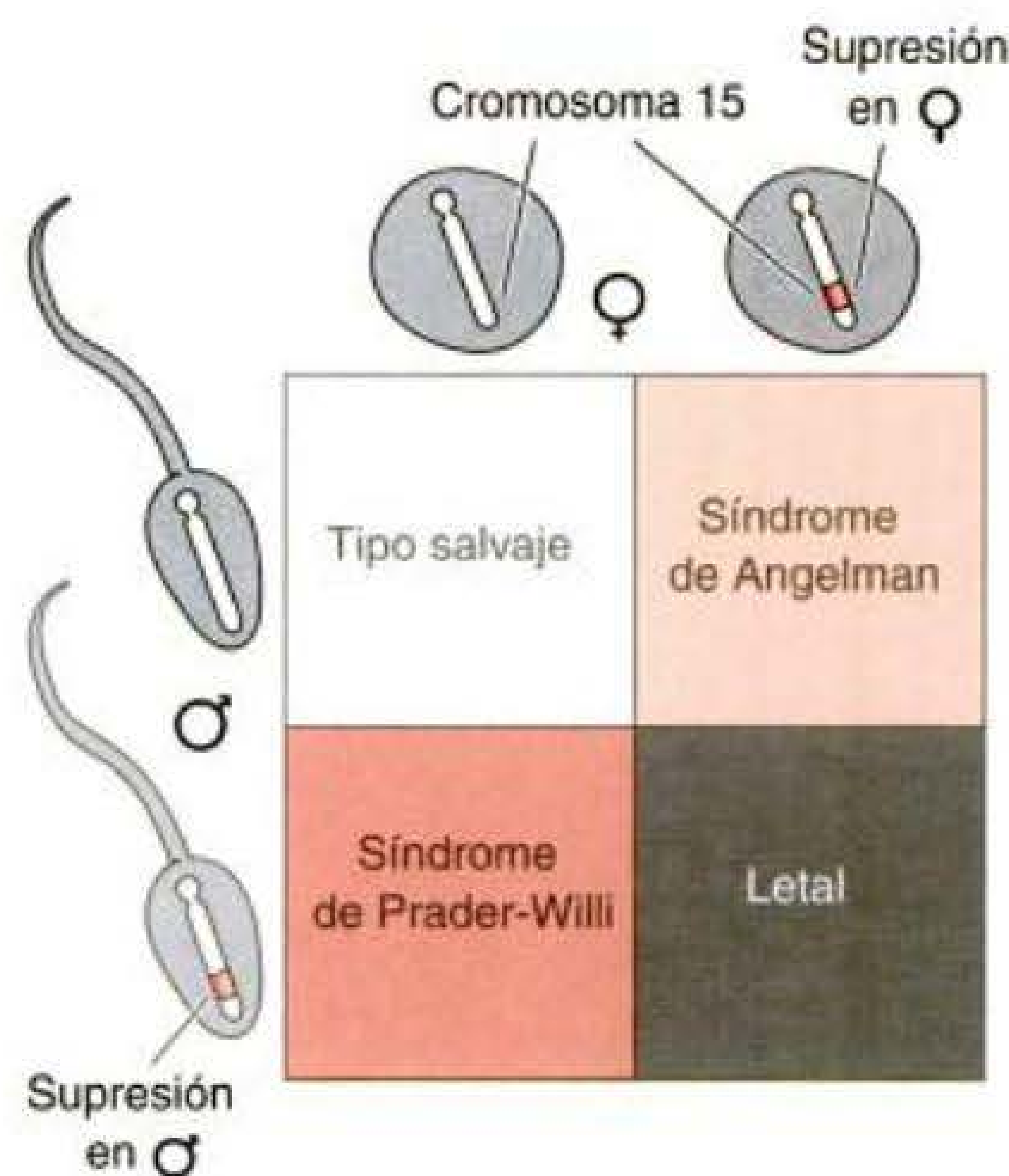


Fig. 5-20. Patrones de herencia para el síndrome de Prader-Willi y de Angelman. Una región en el brazo largo del cromosoma 15 contiene los genes cuya ausencia causa los síndromes. Sin embargo, su impronta se produce de modo inverso. En el síndrome de Prader-Willi, los genes paternos están activos, mientras que en el síndrome de Angelman, los genes maternos son los activos.

SITIO WEB 5.9 **Impronta en seres humanos y en ratones (Imprinting in humans and mice).** Los mecanismos de impronta pueden ser muy diferentes. En humanos, los patrones de metilación afectan la transmisión de ciertas enfermedades, y los genes de β-globina sin metilar pueden ser un remedio para ciertas enfermedades sanguíneas.

Regulación transcripcional de un cromosoma entero: compensación de la dosis

En *Drosophila* y en mamíferos, las hembras se caracterizan por poseer dos cromosomas X por célula, mientras que los machos se caracterizan por tener un único cromosoma X por célula. A diferencia del cromosoma Y, el cromosoma X contiene miles de genes que son esenciales para la actividad celular. Sin embargo, a pesar que las células de las hembras tienen el doble del número de cromosomas X que los que tienen los machos, las células de los machos y de las hembras contienen aproximadamente iguales cantidades de productos génicos codificados por el cromosoma X. Esta igualdad es denominada **compensación de la dosis**. En *Drosophila*, el grado de transcripción del cromosoma X está alterado de modo tal que las células del macho y de la hembra transcriben la misma cantidad de RNA de sus cromosomas X. Ambos cromosomas X de la hembra son activos, pero hay una transcripción incrementada del cromosoma X del macho, de modo tal que el único cromosoma X de las células del macho produce tanto RNA como los dos cromosomas X en las células de las hembras (Lucchesi y Manning 1987). Esto es logrado mediante la acetilación de los nucleosomas en todas las partes del cromosoma X del macho, que da a las RNA polimerasa acceso más eficiente a los promotores de ese cromosoma (Akhtar y col. 2000; Smith y col. 2001).

En mamíferos, la compensación de la dosis se produce a través de la inactivación de uno de los cromosomas X en cada célula de la hembra. Por lo tanto, cada célula somática de mamífero, si es femenina o masculina, tiene solo un cromosoma X en funcionamiento. Este fenómeno es denominado **inactivación del cromosoma X.** La cromatina del cromosoma X inactivo es convertida en **heterocromatina** –cromatina que se mantiene condensada a lo largo de la mayoría del ciclo celular y que se replica más tarde que la mayoría de la otra cromatina (la **eucromatina**) del núcleo. El cromosoma X heterocromático (inactivo), que puede ser visto frecuentemente sobre la envoltura nuclear de las células de las hembras, es referido como un **cuerpo de Barr** (fig. 5-21A, B; Barr y Bertram 1949). Mediante el monitoreo de la expresión de los genes ligados al X cuyos productos pueden ser detectados en los embriones tempranos, fue demostrado que la inactivación del cromosoma X

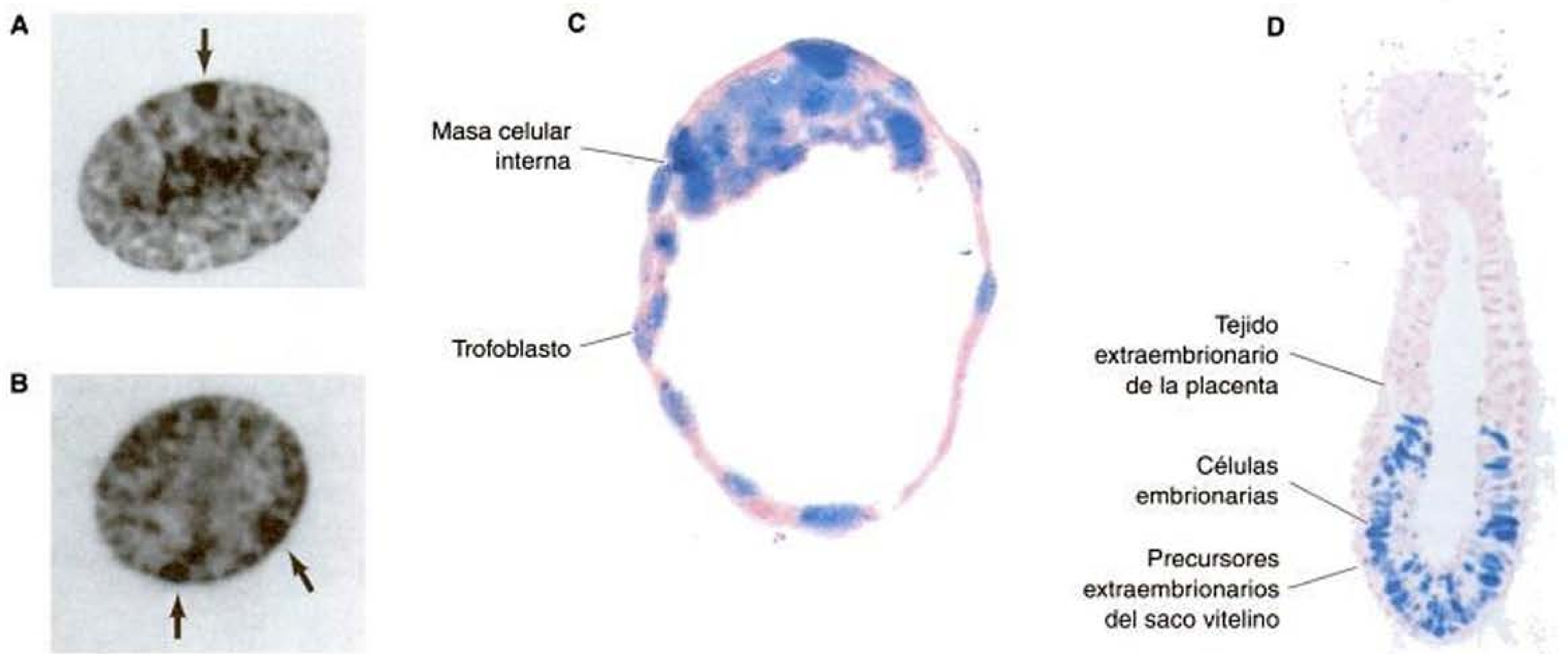


Fig. 5-21. Inactivación de un único cromosoma X en las células XX de mamíferos. **A, B.** Cuerpos de Barr en los núcleos de las células epiteliales de la cavidad oral humana teñidos con violieta de cresilo. **A.** Células de una hembra XX normal, mostrando un único cuerpo de Barr (flecha). **B.** Células de una hembra con tres cromosomas X. Se pueden ver dos cuerpos de Barr, y solamente un cromosoma X por célula está activo. **C, D.** Inactivación del cromosoma X en el embrión temprano de ratón. Los cromosomas X derivados del padre contienen el transgén *lacZ* que es activo en los embriones tempranos. Aquellas células en las que el cromosoma es activo producen β-galactosidasa y pueden ser teñidas de azul. Las otras células están contrateñidas y aparecen de color rosa. **C.** En el estadio de blastocisto temprano en el día 4, ambos cromosomas X están activos en todas las células, por esta razón todas las células aparecen azules. **D.** En el día 6, se produce la inactivación azarosa de uno de los cromosomas. Por lo tanto, las células embrionarias en las que el cromosoma X materno está activo aparecen de color rosa, mientras que aquellas en las que el X paterno es el activo se tiñen de azul. En el trofoblasto del ratón (pero no en el humano), es inactivado preferencialmente el cromosoma X derivado del padre. Así, las células del trofoblasto son uniformemente rosadas. (**A, B,** fotografías cortesía de M. L. Barr; **C, D,** según Sugimoto y col. 2000, fotografías cortesía de N. Takagi.)

se produce temprano en el desarrollo (fig. 5-21C, D). Esta inactivación parece ser crítica. Utilizando un mutante de cromosoma X que no puede ser inactivado, Tagaki y Abe (1990) demostraron que la expresión de los dos cromosomas X por célula en el embrión de ratón lleva a la muerte de las células ectodérmicas y a la ausencia en la formación de mesodermo, provocando finalmente la muerte del embrión a los 10 días de gestación.

La inactivación temprana de un cromosoma X por célula tiene consecuencias fenotípicas importantes. Uno de los análisis más tempranos de la inactivación del cromosoma X fue realizado por Mary Lyon (1961), quien observó los patrones en el color del pelaje de ratones. Si un ratón es heterocigota para un gen autosómico que controla la pigmentación del pelo, entonces se asemeja a uno de sus dos padres, o tiene un color intermedio entre los dos. En cada caso, el ratón tiene un único color. Pero si un ratón hembra es heterocigota para un gen de pigmentación sobre el cromosoma X, se observa un resultado diferente: manchas de un color parental alternan con manchas de otro color parental (fig. 5-22). Lyon propuso la siguiente hipótesis para explicar estos resultados:

1. Muy temprano en el desarrollo de las hembras de mamíferos, ambos cromosomas X son activos.
2. A medida que avanza el desarrollo, uno de los cromosomas X es inactivado en cada célula.
3. Esta inactivación es al azar. En algunas células, el cromosoma X derivado del padre es inactivado; en otras células, el cromosoma X derivado de la madre es apagado.
4. Este proceso es irreversible. Una vez que un cromosoma X ha sido inactivado en una célula, el mismo cromosoma X es inactivado en todas las células de su progenie. Debido a que la inactivación del cromosoma X se produce relativamente temprano en el desarrollo, una región entera de células derivadas a partir de una única célula puede tener a todas sus células con el mismo cromosoma X inactivado. Por lo tanto, todos los tejidos en las hembras de mamíferos son mosaicos de dos tipos celulares.

La hipótesis de Lyon de inactivación del cromosoma X proporciona una excelente explicación de la inactivación diferencial del gen a nivel de la transcripción. Algunas excepciones interesantes a las reglas generales más adelante mostrarán su importancia. Primero, la inactivación del cromosoma X se considera verdadera solamente para las células somáticas, no para las células germinales. En las células germinales femeninas, el cromosoma X inactivo es reactivado poco tiempo después que las células entran en meiosis (Gartler y col. 1973; Migeon y Jelalian 1977). Por lo tanto, en los ovocitos tempranos, ambos cromosomas X no están metilados (y activos). En cada generación, la inactivación del cromosoma X tiene que ser establecida nuevamente.

Segundo, hay algunas excepciones a la regla de la aleatoriedad en el patrón de inactivación. Por ejemplo, la primera inactivación del cromosoma X en el ratón es vista en la porción fetal de la placenta, en donde es inactivado específicamente el cromosoma X derivado del padre (Tagaki 1974; véase fig. 5-21C, D). Tercero, la

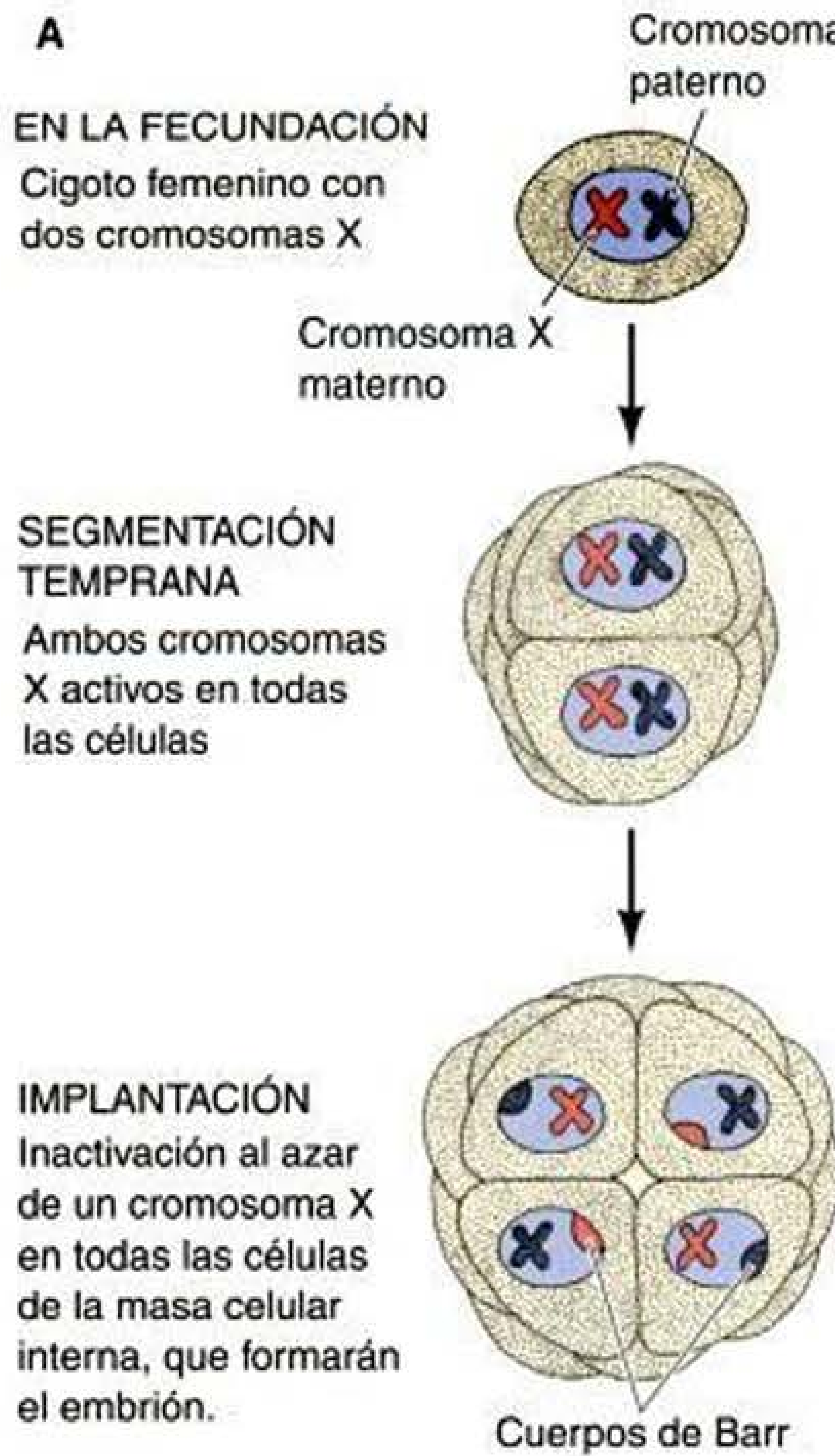




Fig. 5-22. Inactivación del cromosoma X en mamíferos. **A.** Diagrama esquemático que ilustra la inactivación al azar del cromosoma X. La inactivación se cree que se produce cerca del momento de la implantación. **B.** Un gato cálico, cuyas células tienen un cromosoma X con un alelo naranja para un gen de pigmentación y el otro cromosoma X que porta un alelo negro para el gen de pigmentación. Las regiones de diferente color corresponden a la inactivación de uno u otro cromosoma X. (Fotografía cortesía de R. Loredo y G. Loredo.)

inactivación del cromosoma X no se extiende a cada gen sobre el cromosoma X humano. Hay unos pocos genes (como los que codifican sulfatasa esteroidea) sobre ambos brazos del cromosoma X que "escapan" a la inactivación del X (Brown y col. 1997).

La cuarta excepción realmente termina probando la regla. Hay unos pocos machos de mamífero con patrones en el color del pelaje que no deberíamos esperar de encontrar a menos que los animales exhiban inactivación del cromosoma X. Los gatos machos cálicos y tortoiseshell están entre estos ejemplos. Estos patrones de pelajes anaranjados y negros son vistos normalmente en hembras y se piensa que son el resultado de la inactivación al azar del cromosoma X* (véase fig. 5-22B). Pero algunos machos poco comunes también exhiben estos patrones de pelaje. ¿Cómo puede esto ser posibleβ El resultado es que estos gatos son XXY. El cromosoma Y los hace machos, pero un cromosoma X experimenta inactivación, tal como en las hembras, de modo tal que hay solo un X activo por célula (Centerwall y Benirschke 1973). Por lo tanto, estos gatos experimentan inactivación del cromosoma X al azar y sus células tienen un cuerpo de Barr.

Es claro, entonces, que un mecanismo para el control transcripcional de la expresión del gen es producir un gran número de genes heterocromáticos y por lo tanto transcripcionalmente inertes.

SITIO WEB 5-10 **Eliminación y disminución del cromosoma (Chromosome elimination and diminution).** La inactivación o la eliminación de un cromosoma entero no es poco frecuente entre los inverterbrados y es a veces utilizado como un mecanismo de determinación del sexo.

* Aunque los términos *cálico* y *tortoiseshell* son a veces utilizados como sinónimos, los gatos cálicos tienen generalmente también manchas blancas (es decir, manchas sin pigmento).

Información adicional y especulaciones

Los mecanismos de inactivación del cromosoma X

Los mecanismos de inactivación del cromosoma X todavía son pobremente entendidos, pero las nuevas investigaciones están dando algunas indicaciones de los factores que podrían estar involucrados en el comienzo y mantenimiento de un cromosoma X heterocromático.

Comienzo de la inactivación del cromosoma X: RNA Xist

En 1991, Brown y col. encontraron un transcripto de RNA que fue producido únicamente a partir del cromosoma X *inactivo* de seres humanos (Brown 1991a,b). Este transcripto, *XIST*, no codifica una proteína. En su lugar, se localiza dentro del núcleo e interactúa con la cromatina X inactiva, formando un complejo cuerpo Barr-*XIST* (Brown y col. 1992). Una situación similar existe en el ratón, en el que se vio que el transcripto del gen *Xist* cubre

A

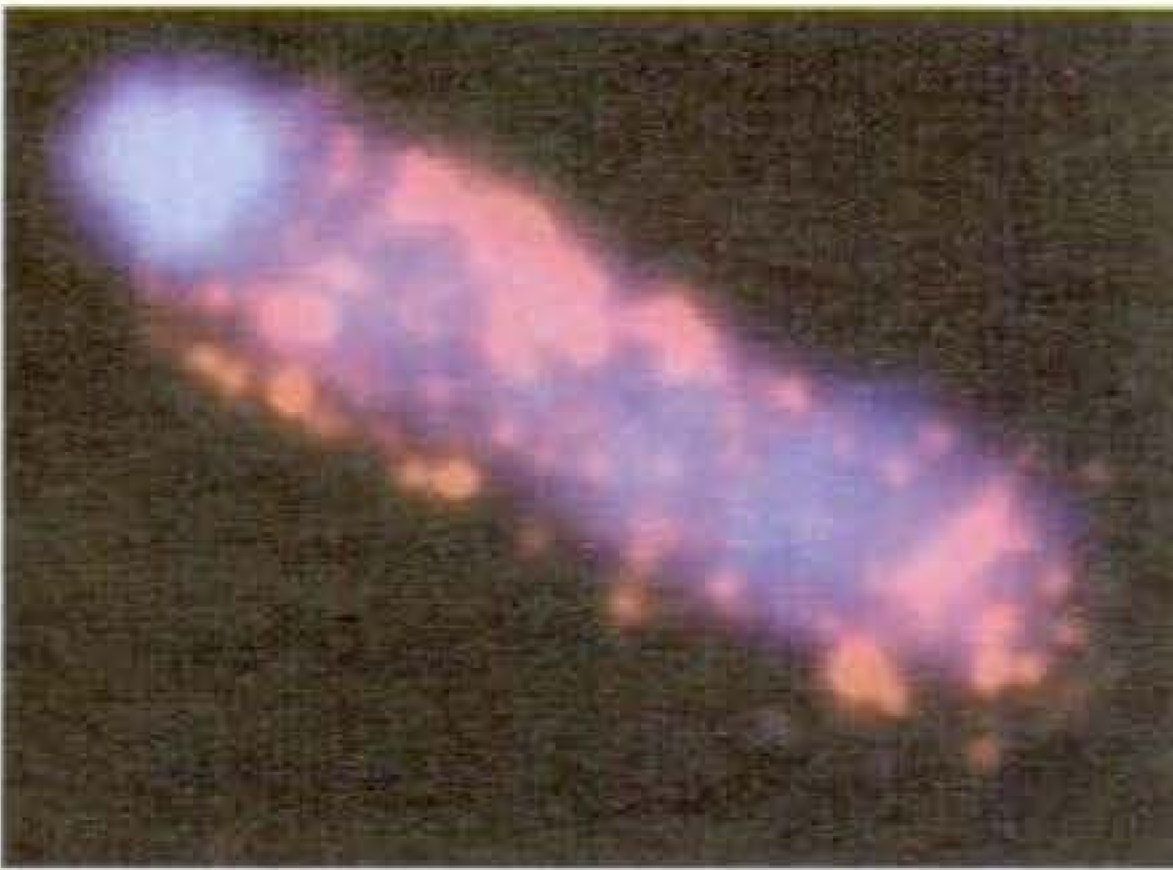
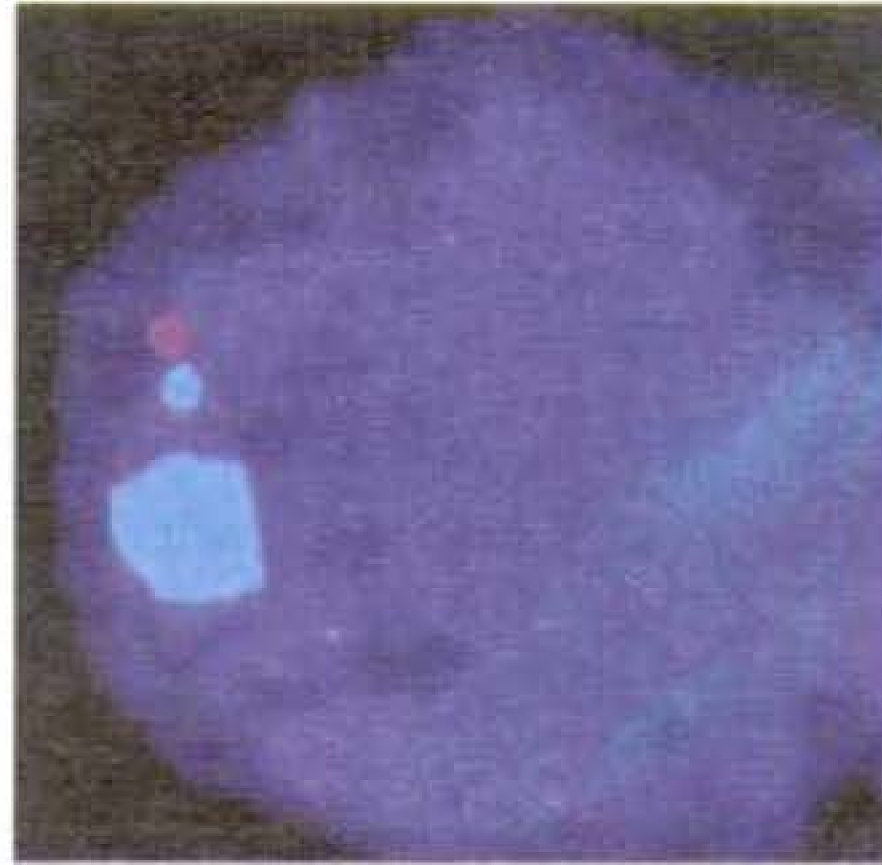


Fig. 5-23. El RNA *Xist* se asocia con la inactivación del cromosoma X producida por éste. **A.** RNA *Xist* de ratón (rojo) sobre un cromosoma X inactivo (azul) en metafase. (En los seres humanos, no se observa que el RNA *XIST* cubra a los cromosomas en metafase.) **B-D.** Células madre embrionarias murinas XX que experimentan la diferenciación e inactivación del cromosoma X. El RNA *Xist* es teñido de celeste; el mRNA del gen de la fosfoglicerato cinasa (*Pgk*) ligada al X es teñido de rojo; el DNA de fondo es teñido de azul. **B.** Las células XX antes de diferenciarse muestran a ambos cromosomas X transcribiendo *Pgk* y *Xist*. **C.** Cuando comienza la inactivación del cromosoma X, el RNA *Xist* es estabilizado sobre uno de los cromosomas. Este cromosoma no transcribe durante más tiempo el gen *Pgk*. **D.** Cuando la célula finaliza la diferenciación, la inactivación del cromsoma X es completa. Un cromosoma X continúa produciendo proteína *Xist*. El otro cromosoma X no produce más *Xist*, pero continúa transcribiendo *Pgk*. (**A**, cortesía de R. Jaenisch; **B-D** de Sheardown y col. 1997, fotografía cortesía de N. Brockdorff.)

B



C



D



al cromosoma X inactivo (fig. 5-23; Borsani y col. 1991; Brockdorrf y col. 1992).

El gen *Xist* es un excelente candidato para iniciar la inactivación del X. En primer lugar, los transcriptos a partir del gen *Xist* son vistos en los embriones de ratón previo a la inactivación del cromosoma X, lo cual se esperaría si este gen juega un papel en iniciar la inactivación (Kay y col. 1993). En segundo lugar, noqueando un locus *Xist* en una célula XX se evita que la inactivación del X ocurra en el cromosoma elegido (Penny y col. 1996). En tercer lugar, la transferencia a un autosoma de ratón de una célula madre embrionaria de un macho de un segmento de unas 450-kilobases conteniendo al gen *Xist*, provoca la inactivación al azar de ese autosoma o del cromosoma X endógeno (Lee y col. 1996). El autosoma es por lo tanto "considerado" como un cromosoma X. En cuarto lugar, *Xist* parece estar involucrado en "elegir" qué cromosoma X es inactivado. Ratones hembras heterocigotas para una eliminación de una región particular del gen *Xist* inactivan preferencialmente al cromosoma tipo salvaje (Marahrens y col. 1998). La expresión de *Xist* es necesaria solo para la iniciación de la inactivación del cromosoma X; una vez que la inactivación se produce, la transcripción de *Xist* es prescindible (Brown y Willard 1994).

El RNA *Xist* funciona solamente en *cis*, es decir, en el cromosoma que lo hizo. Cuando las células comienzan a diferenciarse, el RNA *Xist* es estabilizado sobre uno de los dos cromosomas X (fig. 5-23B-D); Sheardown y col. 1997; Panning y col. 1997). Sin embargo, el mecanismo por el que *Xist* es estabilizado preferencialmente sobre un cromosoma particular parece diferir entre seres humanos y ratones. En los embriones de *ratón* en preimplantación, ambos cromosomas X sintetizan RNA *Xist*, pero su RNA es rápidamente degradado sobre uno de los cromosomas X. Esta estabilización diferencial parece ser afectada por un gen ligado al X denominado *Tsix* ("Xist" deletreado al revés). *Tsix* codifica un RNA pequeño, nuclear no codificante de proteína que contiene la secuencia *antisentido* de *Xist* (Lee y Lu 1999; Chao y col. 2002). El RNA de *Tsix* se asocia con el futuro cromosoma X *activo*, donde éste parece degradar a *Xist*. El gen *TSIX humano*, sin embargo, no posee la región que es antisentido para *XIST*, y el *XIST* humano no parece jugar un papel en la inactivación del cromosoma X (Migeon y col. 2002). Mientras que los ratones hembras con mutaciones en *Tsix* mueren debido a defectos en la inactivación del cromosoma X (Lee 2000; Sado y col. 2001), las células femeninas humanas (con su naturalmente mutante *TSIX*) deben tener algunos otros mecanismos para asegurar la estabilización diferencial de *XIST*.

Mantenimiento de la inactivación del cromosoma X

Una vez que *Xist* comienza la inactivación de un cromosoma X, el silenciamiento del cromosoma se mantiene al menos de dos maneras. El primer modo involucra la metilación del DNA. El locus *Xist* sobre el cromosoma X *activo* llega a ser metilado, mientras que el gen *Xist* activo (en el cromosoma de X de otra manera "inactivo") se mantiene sin metilar (Norris y col. 1994). Por el contrario, las regiones promotoras de numerosos genes están metiladas sobre el cromosoma X inactivo y sin metilar sobre el cromosoma X activo (Wolf y col. 1984; Keith y col. 1986; Migeon y col. 1991). El segundo método de mantenimiento de la inactivación del cromosoma X parece involucrar la modificación de histonas. La metilación de un residuo de lisina sobre la histona H3 ocurre casi inmediatamente después que el RNA *Xist* es visto cubriendo lo que será el cromosoma X inactivo. Esta metilación de histona se produce antes de que sea observado el

silenciamiento transcripcional, y parece comenzar en los nucleosomas que inmediatamente corriente arriba forma el gen *Xist*. Poco tiempo después, la transcripción se detiene, y se produce otra modificación de histonas sobre el cromosoma X inactivo, incluyendo la eliminación de los grupos acetilo de la histona H4 (fig. 5-24, cuadro 5-2; Jeppesen y Turner 1993; Heard y col. 2001; Mermoud y col. 2002). Estos cambios en los nucleosomas pueden crear la heterocromatina que es característica del cuerpo de Barr.

Cuadro 5-2 *Lista de atributos del cromosoma X inactivo*

- Producción de RNA XIST
- Complejo *XIST*/cuerpo de Barr
- Escasa acetilación de la histona H4
- Metilación de la histona H3
- Concentración de la histona macroH2A1
- Asociación a la envoltura nuclear
- Replicación tardía
- Heterocromatina
- Promotores metilados

(Según Jeppesen y Turner 1993.)

Todavía se ignoran los mecanismos mediante los cuales el transcripto *Xist* regula el estado de la cromatina y por el que tiene lugar la extensión o la inactivación. Aún no se comprenden los modos mediante los cuales la transcripción de *Xist* se relaciona con la metilación del DNA. Hasta ahora se desconoce cómo se hace originalmente la elección entre los dos cromosomas X, ni tampoco cómo es transcripto el RNA *Xist* de una región rodeada por genes inactivados. Hay mucho todavía por aprender sobre la compensación de la dosis en mamíferos, como también en otros animales que tienen determinación sexual cromosómica.

SITIO WEB 5.11 **La importancia médica de la inactivación del cromosoma X (The medical importante of X chromosome inactivation).** Los mecanismos responsables de la inactivación del cromosoma X humano pueden diferir significativamente de aquellos que inactivan al cromosoma X del ratón. Además, la inactivación al azar del cromosoma X en la mujer heterocigota para un gen ligado al X mutante (p. ej., hemofilia A) puede provocar la expresión predominante de un alelo mutante, causando la enfermedad en estas mujeres, como en un varón.

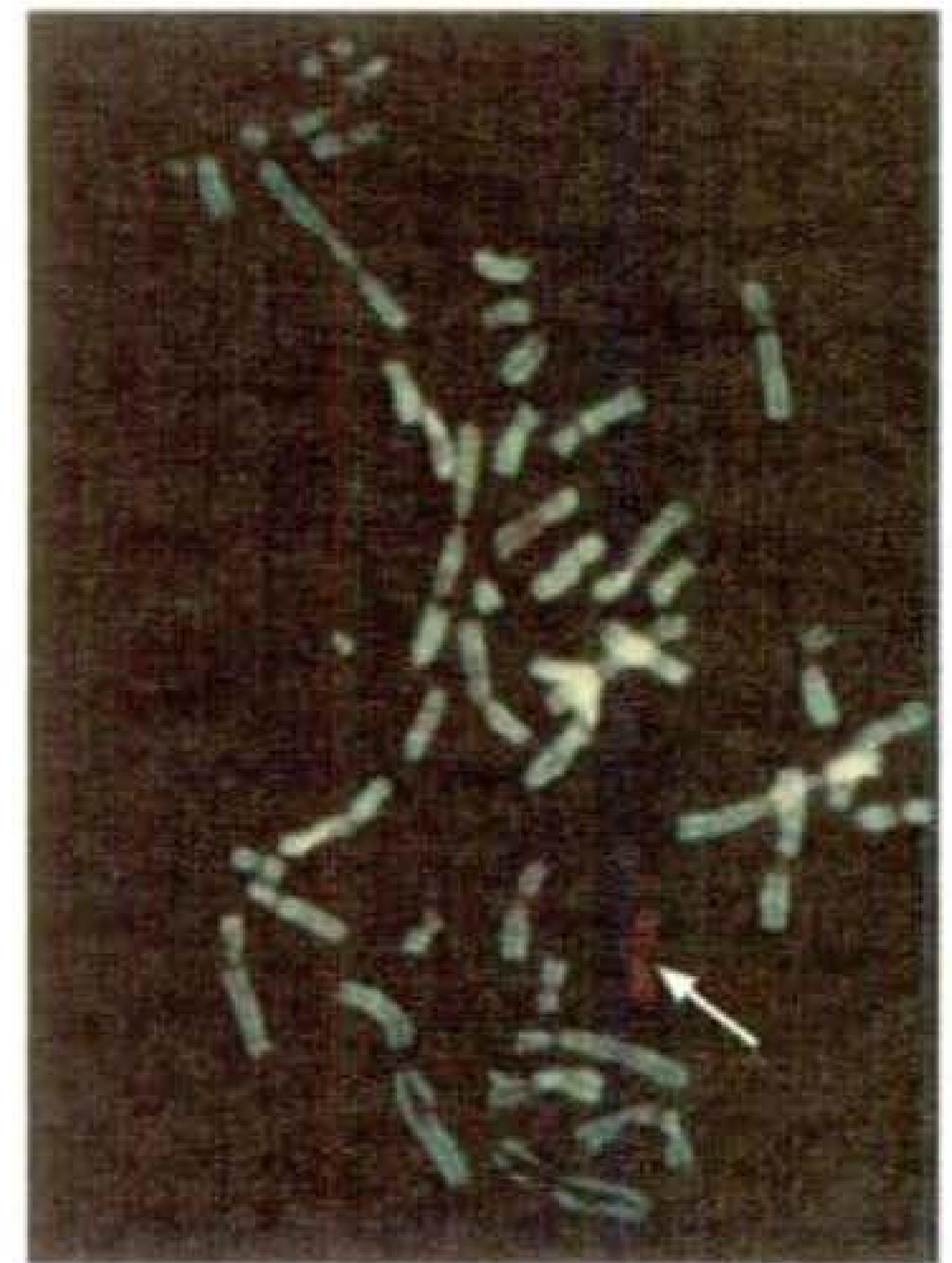


Fig. 5-24. El cromosoma X inactivo de las células femeninas humanas contiene histonas H4 con escasa acetilación. Cromosomas de células de fibroblasto femeninas humanas teñidos de verde con anticuerpo fluorescente para la histona acetilada H4. Mientras que todos los otros cromosomas están teñidos de verde, el X inactivo no lo está y por esta razón aparece rojo (flecha). (De Jeppesen y Turner, 1993; fotografía cortesía de los autores.)

Procesamiento diferencial del RNA

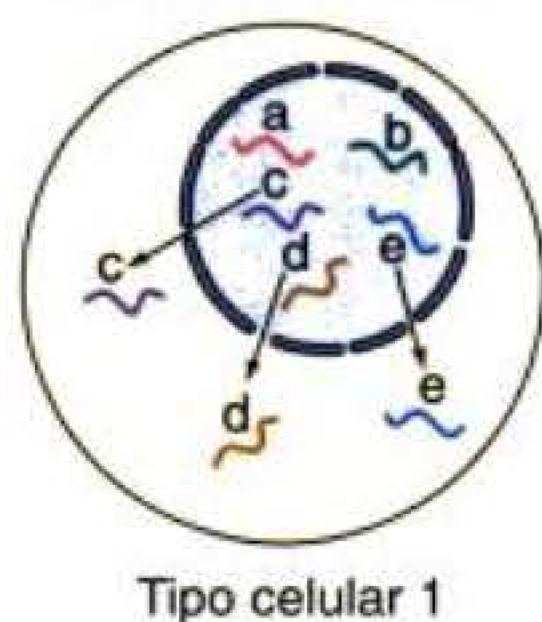
La regulación de la expresión del gen no está limitada a la transcripción diferencial del DNA. Incluso si un transcripto de RNA particular es sintetizado, no hay garantía de que éste creará una proteína funcional en la célula. Para llegar a ser una proteína activa, el RNA debe ser 1) procesado a RNA mensajero mediante la eliminación de los intrones, 2) translocado del núcleo al citoplasma y 3) traducido por el aparato de síntesis de proteína. En algunos casos, la proteína sintetizada no está en su forma madura y para llegar a ser activa debe ser 4) modificada postraduccionalmente. La regulación durante el desarrollo puede llevarse a cabo en cualquiera de estas etapas.

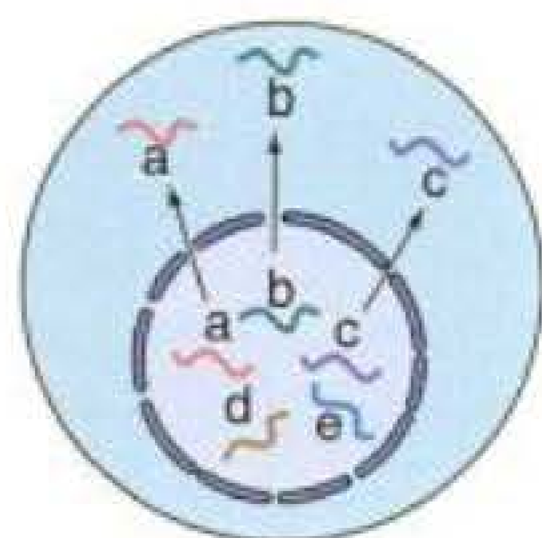
La esencia de la diferenciación es la producción de diferentes grupos de proteínas en diferentes tipos de células. En bacterias, la expresión génica diferencial puede ser llevada a cabo a niveles de la transcripción, traducción y modificación de la proteína. En eucariontes, sin embargo, existe otro nivel posible de regulación –concretamente, el control a nivel del procesamiento y transporte del RNA–. Hay dos formas principales mediante las cuales el procesamiento diferencial del RNA puede regular el desarrollo. La primera implica la "censura"mediante la selección de cuáles de los transcriptos nucleares se procesan en mensajeros citoplasmáticos. Diferentes células seleccionan distintos transcriptos nucleares para ser procesados y enviados como RNA mensajero al citoplasma. De este modo, el mismo fondo común de transcriptos nucleares puede dar origen a diferentes poblaciones de mRNA citoplasmáticos en distintos tipos celulares (fig. 5-25A).

El segundo modo de procesamiento diferencial del RNA es el empalme (splicing) de los precursores de mRNA en mensajeros para diferentes proteínas mediante el uso de distintas combinaciones de los exones potenciales. Si un precursor de mRNA tiene cinco exones potenciales, una célula podría utilizar los exones 1, 2, 4 y 5; una célula diferente podría utilizar los exones 1, 2, y 3; y aún otro tipo de célula podría utilizar incluso otra combinación (fig. 5-25B). Así, un único gen puede producir una familia entera de proteínas relacionadas.

Control del desarrollo temprano mediante la selección del RNA nuclear

A finales de la década de 1970, numerosos investigadores encontraron que el mRNA no era el transcripto primario a partir de los genes. En su lugar, el transcripto inicial es **RNA nuclear (nRNA)**, a veces denominado





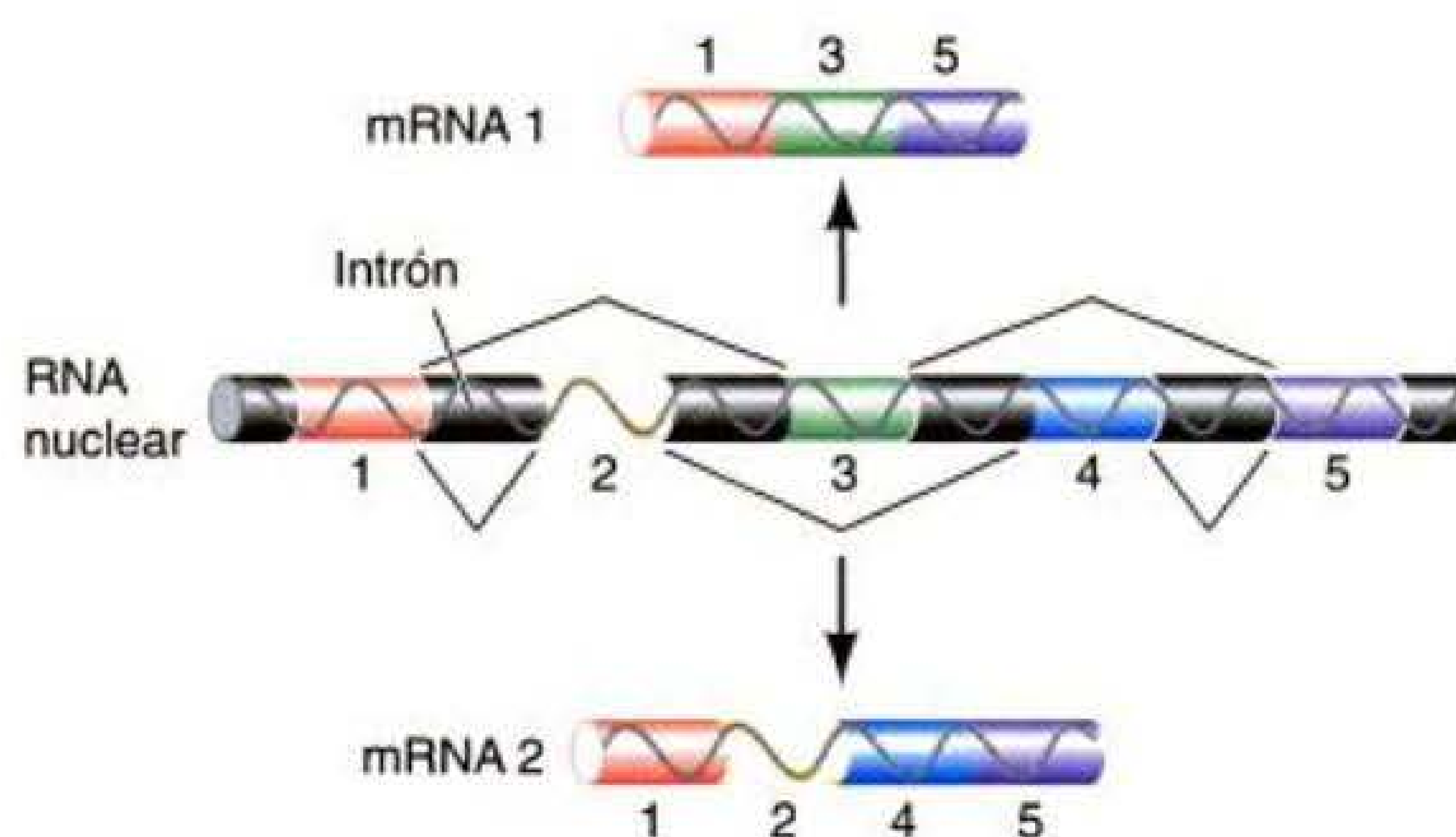


Fig. 5-25. Funciones del procesamiento diferencial del RNA durante el desarrollo. Por convención, los caminos de empalme son indicados con delgadas líneas con forma de V. **A.** Selección de RNA, en la que el mismo transcripto de RNA nuclear es producido en dos tipos celulares, pero se destaca que el grupo que llega a ser citoplasmático es diferente. **B.** Empalme diferencial, en el cual el mismo RNA nuclear es empalmado en diferentes proteínas mediante la eliminación selectiva de los exones posibles.

RNA heterogéneo nuclear (hnRNA, del inglés: heterogeneous nuclear RNA) o RNA pre-mensajero (pre-mRNA). Este nRNA es generalmente muchas veces más largo que el RNA mensajero debido a que el RNA nuclear contiene intrones que son escindidos durante el pasaje del núcleo al citoplasma. Los investigadores pensaron originalmente que cualquier RNA que era transcripto en el núcleo era procesado en mRNA citoplasmático. Pero los estudios en erizos de mar demostraron que los diferentes tipos celulares podrían *transcribir* el mismo tipo de RNA nuclear, pero *procesando* diferentes subgrupos de esta población en mRNA en distintos tipos de células (Kleene y Humphreys 1977, 1985). Wold y col. (1978) demostraron que secuencias presentes en el RNA *mensajero* de las blástulas de erizo de mar, pero ausentes en el mRNA tisular de gástrulas y adultos, sin embargo, estaban presentes en el RNA nuclear de los tejidos de gástrula y adulto.

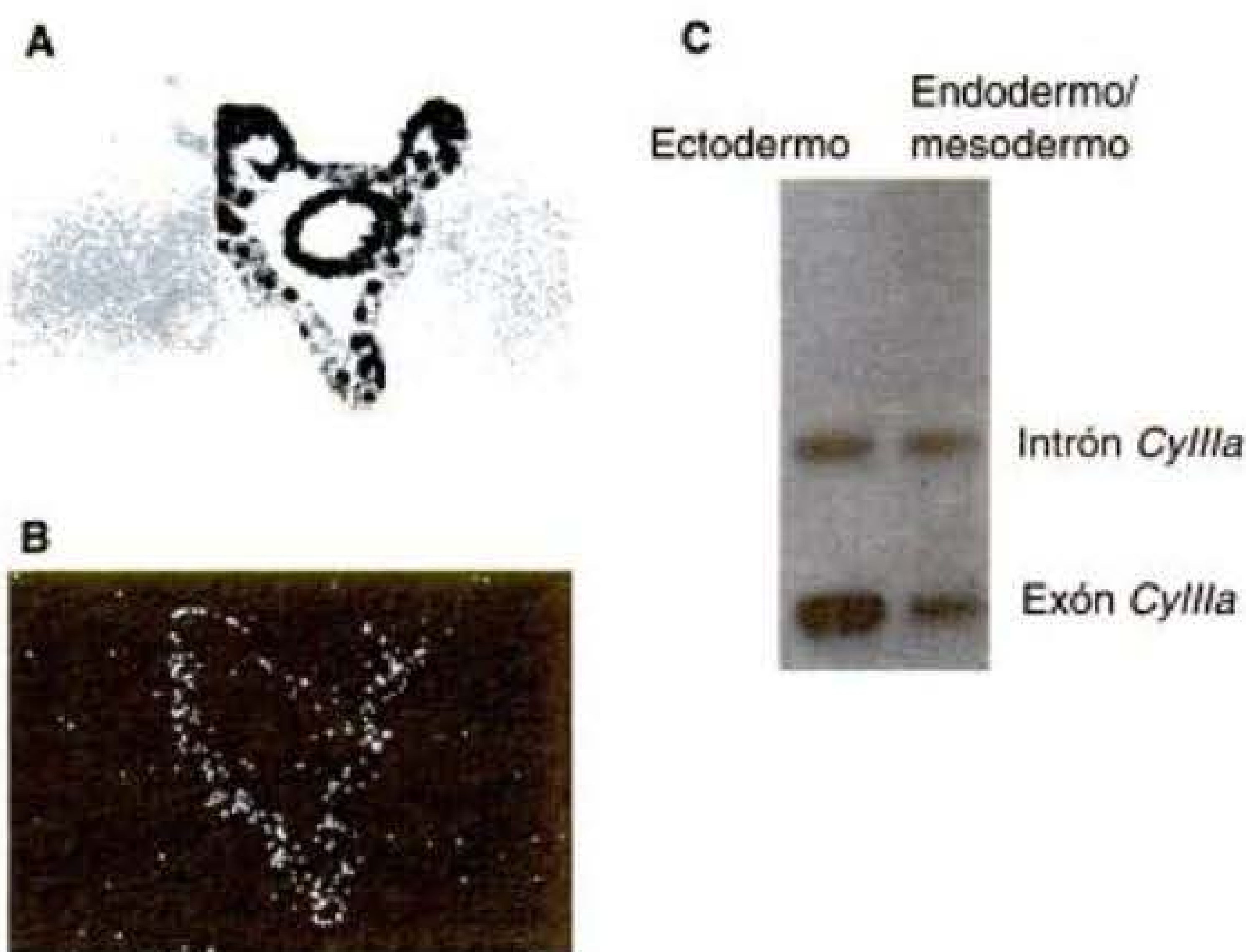


Fig. 5-26. Regulación de la expresión de genes específicos de ectodermo mediante el procesamiento del RNA. **A, B.** Se observa mediante autoradiografía que el mRNA de *CyIIIa* está presente únicamente en el ectodermo. **A.** Microfotografía de contraste de fase. **B.** Hibridación in situ utilizando una sonda que se une al exón *CyIIIa*. **C.** El transcripto nuclear *CyIIIa*, sin embargo, es hallado en el ectodermo y en endodermo/mesodermo. La calle de la izquierda del gel representa a RNA aislado del tejido ectodérmico de la gástrula; la calle de la derecha representa a RNA aislado de los tejidos endodérmicos y mesodérmicos. La banda superior es el RNA unido por una sonda que se une a una secuencia intrón (que puede ser encontrada solamente en el núcleo) de *CyIIIa*. La banda inferior representa al RNA unido por una sonda complementaria a una secuencia exón. La presencia de un intrón indica que el RNA nuclear *CyIIIa* es producido por ambos grupos de células, incluso si el mRNA es visto solamente en el ectodermo. (De Gagnon y col. 1992; fotografía cortesía de R. y L. Angerer.)

En el núcleo se transcriben más genes de los que se permite que lleguen a ser mRNA en el citoplasma. Este "censuramiento" de transcriptos de RNA ha sido confirmado mediante sondas para los intrones y exones de genes específicos. Gagnon y sus colegas (1992) llevaron a cabo tales análisis sobre los transcriptos de los genes *SpecII* y *CyIIIa* del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Estos genes codifican proteínas ligadoras de calcio y de actina, respectivamente, que son expresadas únicamente en una parte particular del ectodermo de la larva del erizo del mar. Utilizando sondas que se unen a un exón (que está incluido en el mRNA) y para un intrón (que no está incluido en el mRNA), hallaron que estos genes estaban siendo transcriptos no solo en las células ectodérmicas, sino también en el mesodermo y en el endodermo. El análisis del gen *CyIIIa* demostró que la concentración de intrones fue la misma en el ectodermo de la gástrula y en las muestras mesodermo/endodermo, sugiriendo que este gen estaba siendo transcripto con la misma proporción en los núcleos de todos los tipos celulares, pero fue transformado en mRNA citoplasmático solamente en las células ectodérmicas (fig. 5-26). El nRNA sin procesar para *CyIIIa* es degradado mientras se lo mantiene frenado en el núcleo de las células endodérmicas y mesodérmicas.

SITIO WEB 5-12 **Censura diferencial del nRNA (Differential nRNA censoring).** Los estudios de la censura diferencial del nRNA anularon el paradigma referido a que la transcripción diferencial del gen era el último medio de regulación de la diferenciación embrionaria. Éste "liberó" a la embriología de los modos microbiológicos de pensar sobre la expresión del gen.

SITIO WEB 5-13 **Un gen al revés** (o interior-exterior) **(An inside-out gene).** Algunos RNA para funcionar permanecen en el núcleo. En un caso interesante, el exón sale del núcleo para ser degradado, mientras que los intrones permanecen y ayudan a la construcción del nucléolo.

Creación de familias de proteínas a través del empalme (splicing) diferencial del nRNA

El empalme alternativo del nRNA es un medio para producir una amplia variedad de proteínas a partir del mismo gen. El nRNA de vertebrado promedio consiste en varios exones relativamente cortos (tienen un promedio de 140 bases) separados por intrones que son usualmente más largos. La mayoría de los nRNA de mamíferos contiene numerosos exones. Mediante el empalme de diferentes grupos de exones, distintas células pueden producir diferentes tipos de mRNA, y por consiguiente, diferentes proteínas. El reconocimiento de una secuencia de nRNA como un exón o un intrón es una etapa decisiva en la regulación del gen. Lo que en núcleo celular es un intrón, en otro núcleo celular puede ser un exón.

El empalme alternativo de nRNA está basado en la determinación de qué secuencias serán escindidas como intrones (no serán empalmadas). Esto se puede llevar a cabo de varios modos (fig. 5-27). La mayoría de los genes contienen "secuencias consenso" en los extremos 5' y 3' de los intrones. Estas secuencias son también denominadas los "sitios de empalme" del intrón. El empalme del nRNA es mediado a través de complejos conocidos como **spliceosomas** (spliceosome) que se une a estos sitios de empalme. Los spliceosomas están constituidos por los RNA nucleares pequeños (snRNAa) y proteínas denominadas factores de empalme que se unen a sitios de empalme o a áreas adyacentes a ellos. Mediante la producción de factores de empalme específicos, las células pueden diferir en su capacidad para reconocer el sitio de empalme 5' (al comienzo del intrón) o el sitio de empalme 3' (al final del intrón). Algunas células pueden fallar en reconocer una secuencia como un intrón en absoluto, reteniéndolo de este modo en el mensaje.

El sitio de empalme 5' es reconocido normalmente por un RNA nuclear pequeño U1 (U1 snRNA) y por el factor 2 de empalme (SF2; también conocido como factor de empalme alternativo). La elección del sitio de empalme alternativo 3' es a menudo controlada por aquel sitio de empalme que se pueda unir mejor a la proteína denominada U2AF. Los spliceosomas se forman cuando las proteínas que se acumulan en el sitio de empalme 5' contactan con aquellas proteínas unidas al sitio de empalme 3'. Una vez que los extremos 5' y 3' son acercados, el intrón interpuesto es eliminado y los dos exones son unidos.

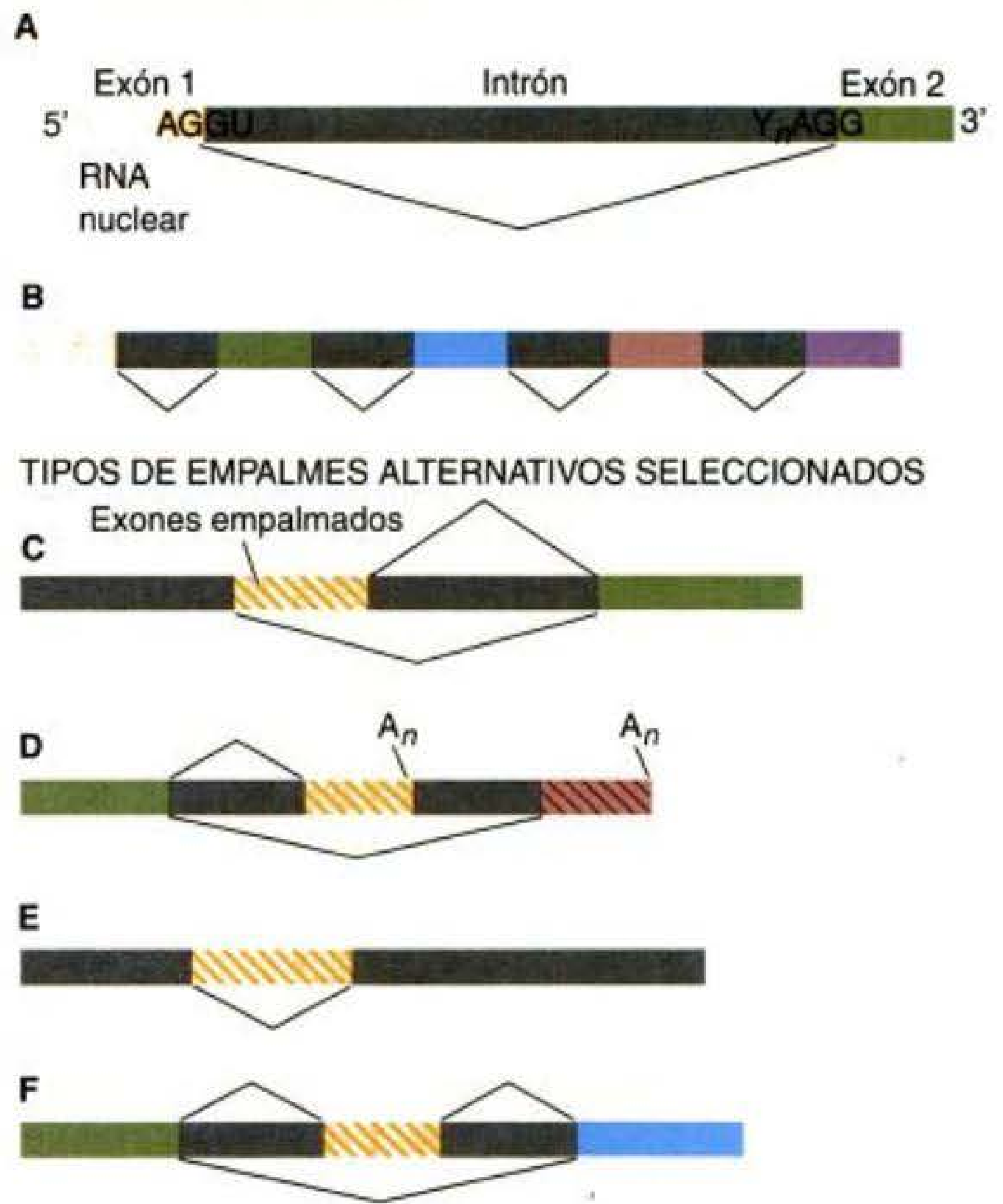


Fig. 5-27. Diagrama esquemático del empalme alternativo de nRNA. Las partes coloreadas de las barras representan a los exones; los exones empalmados alternativamente están indicados mediante rayas. Las partes grises de las barras representan a los intrones. **A.** Los bordes exón-intrón, muestran las secuencias consenso en los extremos 5' y 3' del intrón. Y representa a la pirimidina. **B.** Empalme de un mRNA que tiene cinco exones. **C-F.** Empalme alternativo mediante C sitios 5' de empalme alternativo. **D.** Sitios 3' de empalme alternativo (en algunos casos, esto proporcionará diferentes terminaciones al mRNA, y ambos sitios podrían necesitar una secuencia de poliadenilación, aquí mostrada como A_n). **E.** Una decisión de empalmar/no empalmar. **F.** Incluir el exón/saltarse el exón. (Según Horowitz y Krainer 1995.)

SITIO WEB 5-14 **El mecanismo de empalme diferencial de nRNA (The mechanism of differential nRNA splicing).** El empalme diferencial del nRNA depende del ensamblaje del nucleosoma y de la proporción de ciertas proteínas en el núcleo de la célula.

Se ha visto que el procesamiento del RNA diferencial permite controlar las formas alternativas de expresión de los genes que codifican más de 100 proteínas. La supresión de ciertos exones potenciales en algunas células pero no en otras le permite a un gen crear una familia de proteínas estrechamente relacionadas. En lugar de un gen-un polipéptido, se puede tener un gen-una familia de proteínas. Por ejemplo, el empalme alternativo de RNA le permite al gen de la β-tropomiosina codificar formas

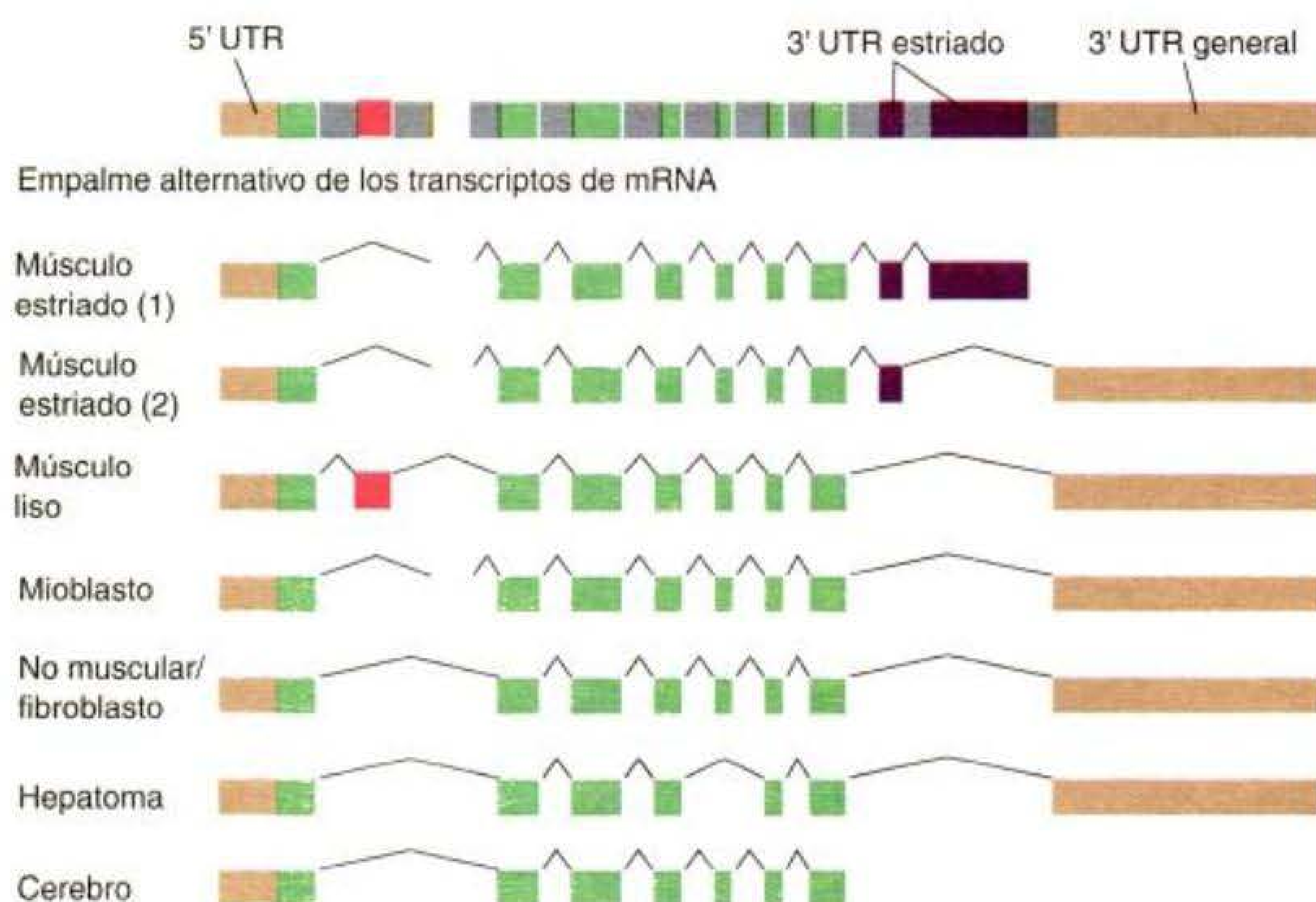


Fig. 5-28. Empalme alternativo de RNA para formar una familia de proteínas de α-tropomiosina de rata. Los genes de la α-tropomiosina están representados en la parte superior. Las líneas delgadas representan las secuencias que llegan a ser intrones y que son eliminadas del empalme para formar los mRNA maduros. Los exones constitutivos (hallados en todas las tropomiosinas) son mostrados en verde. Aquellos que se expresan solamente en el músculo liso son rojos; aquellos expresados solamente en el músculo estriado son violetas. Aquellos que se expresan variadamente son amarillos. Nótese que además de muchas combinaciones posibles de exones, son posibles dos alternativas de extremos 3' diferentes. (Según Breitbart y col. 1987.)

de esta proteína en el cerebro, hígado, músculo esquelético, músculo liso y fibroblastos (fig. 5-28; Breitbart y col. 1987). El RNA nuclear para β-tropomiosina contiene 11 exones potenciales, pero diferentes grupos de exones son utilizados en distintas células. Dichas proteínas diferentes codificadas por el mismo gen son denominadas **isoformas empalmadas** de la proteína.

En algunos ejemplos, RNA empalmados de manera alternativa producen proteínas que juegan un papel similar aunque distinguible en la misma célula. Las diferentes isoformas de la proteína WT1 desempeñan diferentes funciones en el desarrollo de las gónadas y de los riñones. La isoforma sin el exón extra funciona como un factor de transcripción durante el desarrollo renal, mientras que la isoforma conteniendo un exón extra parece estar involucrada en empalmar diferentes nRNA y podría ser crítica en el desarrollo del testículo (Hastie 2001; Hammes y col. 2001). En *Drosophila*; el transcripto del gen *Held-out wings* (alas sostenidas-hacia fuera) puede ser empalmado de dos modos. Uno de los mRNA obtenidos codifica una proteína que inhibe la diferenciación del tendón, mientras que el otro codifica una proteína que estimula la diferenciación del tendón. Las cantidades relativas de estos dos transcriptos durante el desarrollo regulan el estado de diferenciación de las células en el tendón de modo tal que estas células maduran en los tiempos apropiados (Nabel-Rosen y col. 2002).

Si se tiene la impresión a partir de esta discusión que un gen con docenas de intrones puede crear literalmente miles de proteínas relacionadas diferentes, a través del empalme diferencial, probablemente se está en lo correcto. Por ejemplo, las proteínas derivadas a partir de los genes de neurexina son halladas sobre las superficies celulares de las neuronas en desarrollo y podrían ser importantes en la especificación de las conexiones que establecen estas neuronas.* Los RNA transcriptos a partir de los genes de neurexina pueden ser empalmados alternativamente en varios sitios diferentes, creando cientos de proteínas diferentes a partir del mismo gen (Ullrich y col. 1995; Ichtchenko y col. 1995).

El último ganador en producir múltiples proteínas a partir del mismo gen es el gen *Dscam* de *Drosophila*, que está involucrado en la guía de los axones hacia sus objetivos durante el desarrollo del insecto. El gen *Dscam* contiene 24 exones. Sin embargo, más de una docena de secuencias de DNA adyacentes diferentes pueden ser seleccionadas para ser exón 4. Del mismo modo, al menos una docena de secuencias de DNA adyacentes mutuamente excluyentes pueden llegar a ser los exones 6 y 9 (fig. 5-29; Schmucker y col. 2000). Se ha visto que el nRNA de *Dscam* es empalmado alternativamente en diferentes axones y puede controlar la especificidad de la unión del axón (Celotto y Graveley 2001). Si son utilizadas todas las combinaciones posibles de exones, este único gen puede producir 38.016 proteínas diferentes, y la búsqueda al azar para estas combinaciones indica que una gran fracción de éstas son en realidad producidas. Se piensa que el genoma de *Drosophila* contiene únicamente 14.000 genes; pero aquí hay un único gen que codifica tres veces este número de proteínas! Se estima que al menos el 35% de los genes humanos producen alternativamente RNA empalmados (Croft y col. 2000). Por lo tanto, aún cuando el genoma humano puede contener solamente 35.000-80.000 genes, su **proteoma** –el número y tipos de proteínas codificadas por el genoma– es probablemente mucho más complejo.

* Las neurexinas son moléculas de reconocimiento celular y parecen estar involucradas en la adhesión y reconocimiento neurona-neurona. El veneno de la araña viuda negra funciona mediante la unión a las neurexinas, provocando la liberación masiva de neurotransmisor (Rosenthal y Meldolesi 1989).

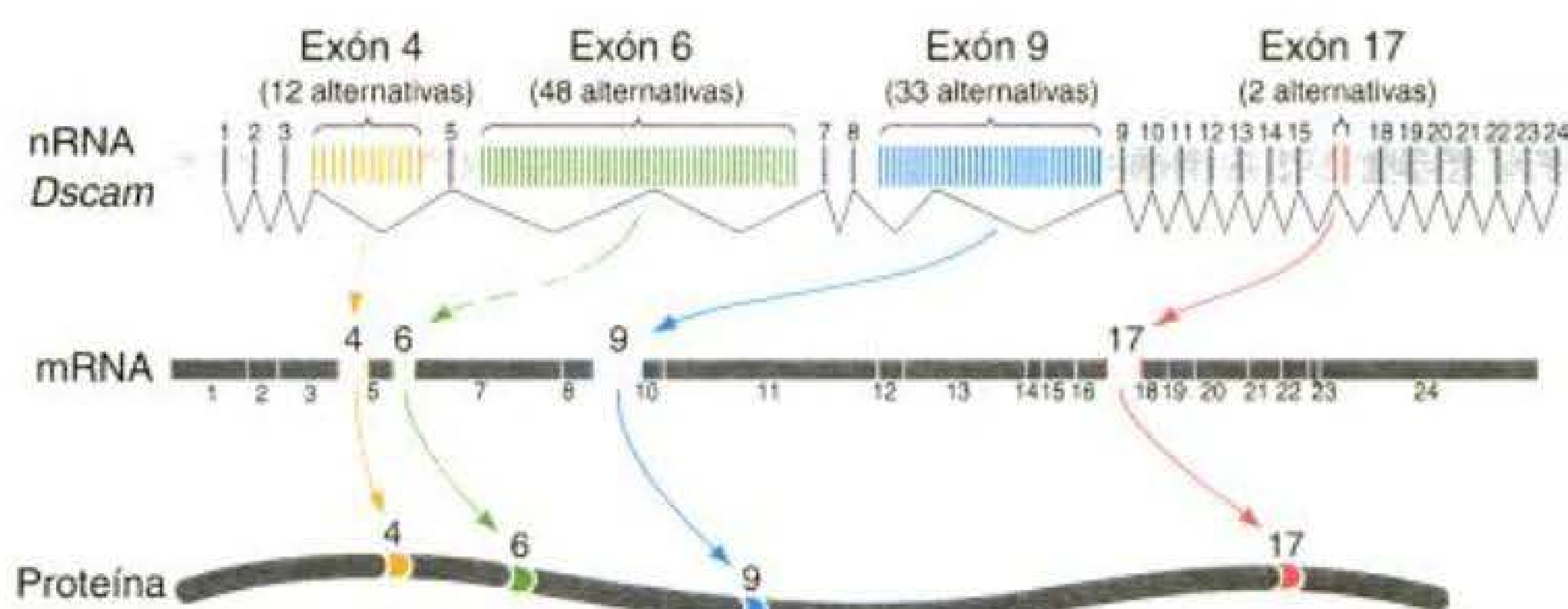


Fig. 5-29. El gen *Dscam* de *Drosophila* puede producir 38.016 tipos de proteínas diferentes mediante el empalme alternativo de nRNA. El gen contiene 24 exones. Los exones 4, 6, 9 y 17 son codificados por un grupo de secuencias que pueden excluirse mutuamente. Cada RNA mensajero contendrá una de las 12 secuencias posibles del exón 4, una de las 48 alternativas posibles del exón 6, una de las 33 alternativas posibles del exón 9, y una de las dos secuencias posibles del exón 17. El gen *Dscam* de *Drosophila* es homólogo a la secuencia de DNA humano sobre el cromosoma 21 que es expresada en el sistema nervioso humano. Las alteraciones de este gen en el ser humano podrían llevar a los defectos neurológicos del síndrome de Down (Yamkawa y col. 1998; Saito 2000.)

Información adicional y especulaciones

Procesamiento diferencial del nRNA y determinación del sexo en Drosophila

La determinación del sexo en *Drosophila* está regulada a través de una cascada de acontecimientos de procesamiento del RNA (Baker y col. 1987; MacDougall y col. 1995). Como se verá en el capítulo 17, el desarrollo del fenotipo sexual en *Drosophila* está mediado por el cociente entre los cromosomas X en relación a los autosomas (cromosomas no sexuales). Los cromosomas X producen factores de transcripción que activan al gen *Sex-lethal (Sxl)* (Sexo-mortal),* mientras que los autosomas producen factores de transcripción que reprimen al gen *Sxl*. Por lo tanto, estos dos grupos de factores de transcripción –activadores a partir del X y represores desde los autosomas– compiten por los sitios potenciadores del gen *Sxl*. Cuando el cociente X-autosomas es 1 (es decir, cuando hay dos cromosomas X por célula diploide), dominan los activadores, el gen *Sxl* está activo y el embrión se desarrolla como hembra. Cuando el cociente es 0.5 (p. ej., cuando la mosca es XY con únicamente un cromosoma X por célula diploide), dominan los represores, el gen Sxl no está activo, y el embrión se desarrolla como macho (fig. 5-30).

Pero ¿qué está haciendo la proteína Sxl para determinar el sexo? Está actuando como un factor de empalme diferencial sobre el nRNA transcripto a partir del gen *transformer (tra)* (transformador). Durante el período larval, el gen *tra* sintetiza activamente un

* El nombre de este gen, *Sex-lethal*, viene del desacoplamiento mortal que se origina del mecanismo de compensación de la dosis cuando este gen es mutado. Cuando esto sucede, la mosca se convertirá en macho aun si ésta es XX. Sin embargo, estos dos cromosomas X serán instruidos para transcribir sus genes a gran velocidad (macho), creando defectos regulatorios que matan al embrión (Cline 1986).

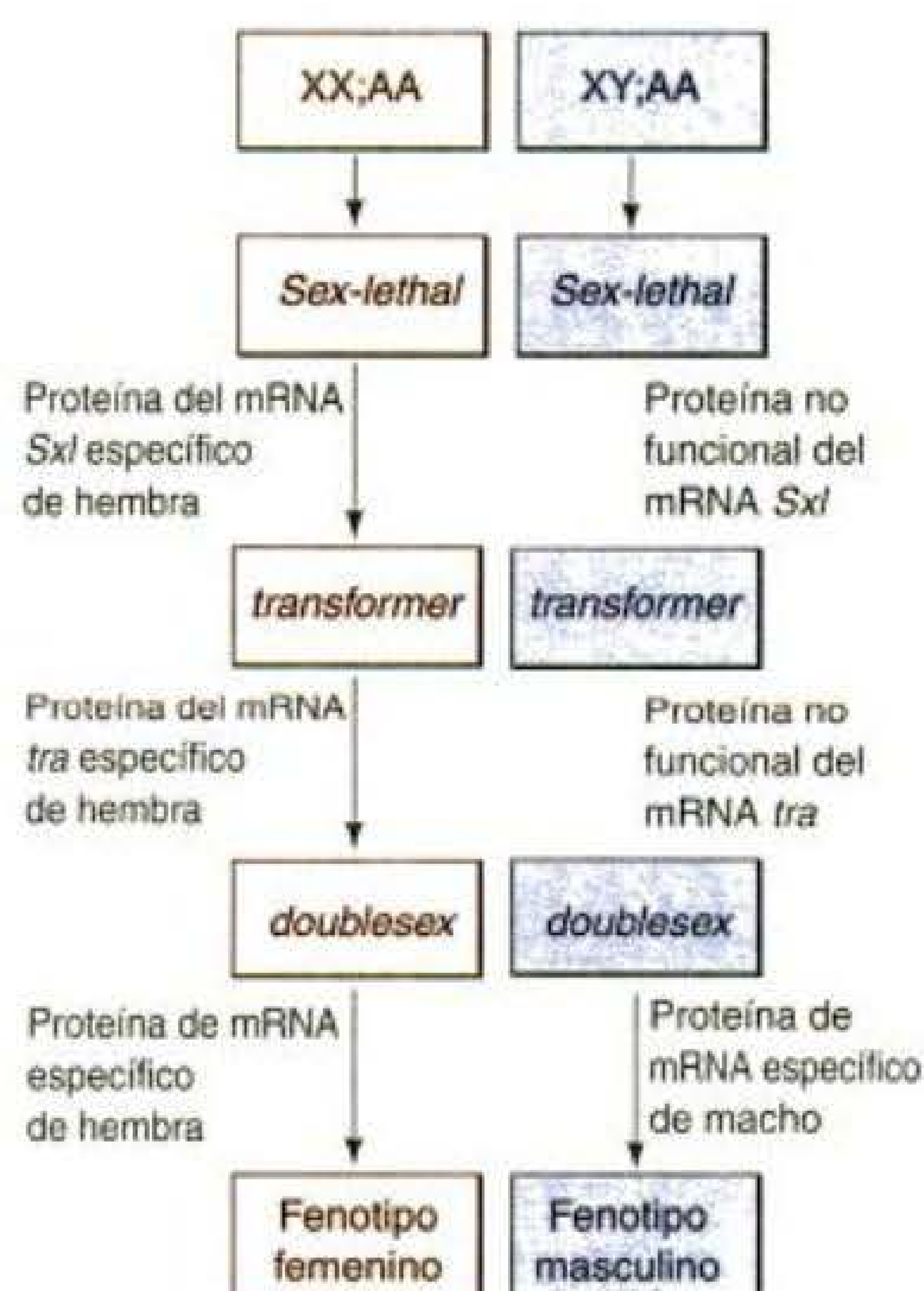


Fig. 5-30. Determinación sexual en *Drosophila*. Este esquema simplificado muestra que el cociente de X-autosomas es monitoreado por el gen *Sex-lethal*. Si este gen está activo, procesa el nRNA *transformer* a un mensajero funcional específico de la hembra. Ante la presencia de proteínas Transformer específicas de la hembra, el transcripto del gen doublesex es procesado de una forma específica de la hembra. La proteína Doublesex específica de la hembra es un factor de transcripción que lleva a la producción de un fenotipo de hembra. Si el gen *transformer* no genera productos específicos de la hembra (p. ej., si el gen *Sex-lethal* no es activado), el transcripto *doublesex* es empalmado de un modo específico para el macho, llevando a la formación de proteína Doublesex específica del macho. Éste es un factor de transcripción que genera el fenotipo masculino.

transcripto nuclear que es procesado a un mRNA general (encontrado en machos y hembras) o un mRNA específico de hembra. El mensajero específico de hembra es producido cuando la proteína Sxl se une al nRNA e inhibe la formación de los spliceosomas sobre el sitio de empalme general 3' del primer intrón (Sosnowski y col. 1989; Valcárcel y col. 1993). En su lugar, el spliceosoma se forma sobre otro sitio 3' menos eficiente y permite que el empalme se produzca aquí. Como resultado, la forma femenina del mRNA *transformer* carece de un exón encontrado en la forma general. Y esta diferencia es decisiva, debido a que este exón contiene un codón de terminación de la traducción (UGA) que hace que el mensaje genere una proteína pequeña no funcional. Por lo tanto, el transcripto general produce una proteína no funcional (Belote y col. 1989). Sin embargo, en el mensajero específico de la hembra, el codómn UGA es eliminado durante la formación del mRNA y no interfiere con la traducción del mensaje. En otras palabras, el transcripto específico de la hembra *tra* es el único transcripto funcional de este gen.

La proteína Tra es a sí mismo un factor de empalme alternativo que regula el empalme del transcripto nuclear del gen *doublesex (dsx).* Este gen es necesario para la producción de uno u otro fenotipo sexual, y las mutaciones de dsx pueden invertir el fenotipo sexual esperado, provocando que los embriones XX lleguen a ser machos o que los embriones XY se conviertan en hembras. Durante la pupación, el gen dsx produce un transcripto nuclear que puede ser procesado en dos modos alternativos. Puede generar un mRNA específico de la hembra o uno específico del macho (Nagoshi y col. 1988). Los tres primeros exones del mRNA de dsx son los mismos en los machos y en las hembras (Tian y Maniatis 1992, 1993). Pero si la proteína Tra esta presente, ésta transforma un sitio de empalme 3' débil en un sitio fuerte (es decir, un sitio de unión más eficiente de U2AF), y el exón 4 es retenido, resultando en mRNA de *dsx* específico de hembra. Si la proteína Tra no está presente, U2AF no se unirá al sitio 3', y el exón 4 no será incluido, resultando en el mensajero dsx específico de macho. Las proteínas Doublesex producidas por los mRNA del macho y de la hembra son factores de transcripción, y reconocen la misma secuencia de DNA. Sin embargo, mientras que las proteínas Dsx femeninas activan a potenciadores específicos de la hembra (como aquellos sobre los genes codificadores de proteínas del vitelo), las proteínas Dsx del macho inhiben la transcripción de aquellos mismos potenciadores (Coschigano y Wensink 1993; Jursnich y Burtis 1993). Por el contrario, la proteína femenina puede inhibir la transcripción de genes que son por otra parte activados por la proteína del macho. La investigación en la determinación sexual en *Drosophila* muestra que el procesamiento diferencial del RNA juega papeles enormemente importantes a través del desarrollo.

Control de la expresión del gen a nivel de la traducción

El empalme del RNA nuclear está estrechamente conectado con su exportación a través de los poros nucleares y en el citoplasma. Cuando los intrones están siendo quitados, proteínas específicas se unen al spliceosoma y adhieren el complejo spliceosoma-RNA a los poros nucleares (Luo y col. 2001; Sträßer y Hurt 2001). Pero una vez que el RNA ha alcanzado el citoplasma, todavía no hay garantía de que éste será traducido. El control de la expresión del gen a nivel de la traducción puede producirse por varios medios; algunos de los más importantes serán descritos a continuación.

Longevidad diferenciada del mRNA

Cuanto más tiempo persiste un mRNA, hay más probabilidades que se pueda traducir la proteína a partir de éste. Si un mensajero con una vida media relativamente corta fuera selectivamente estabilizado en ciertas células en determinados momentos, éste producirá grandes cantidades de su proteína particular únicamente en aquellos momentos y lugares. La estabilidad de un mensajero es a menudo dependiente de la longitud de su cola de poli(A). Ésta, a su vez, parece depender de secuencias en la región 3' sin traducir. Ciertas secuencias 3' UTR permiten colas de poli(A) más largas que otras. Si estas regiones 3´ UTR son intercambiadas experimentalmente, las vidas medias de los mRNA resultantes son alteradas: los mensajeros de larga vida media declinan rápidamente, mientras que los mRNA que normalmente tienen vida media corta se mantendrán cercanos a los de vida más larga (Shaw y Kamen 1986; Wilson y Treisman 1988; Decker y Parker 1994).

En algunos ejemplos, los RNA mensajeros son estabilizados selectivamente en momentos específicos en células específicas. El mRNA para caseína, la principal proteína de la leche, tiene una vida media de 1,1 horas en el tejido de la glándula mamaria de rata. Sin embargo, durante los períodos de lactancia, la presencia de la hormona prolactina incrementa esta vida media a 28,5 horas (fig. 5-31; Guyette y col. 1979). En *Drosophila*, la proteína Stripe (raya) es un factor de transcripción que regula positivamente la diferenciación del tendón de *Drosophila*. Éste es regulado a nivel traduccional mediante las proteínas codificadas por el gen *Held-out-wings* mencionado anteriormente. La isoforma más larga de Held-out-wings lleva a la degradación del mRNA *Stripe*, mientras que la isoforma más corta de la proteína Held-out-wings estabiliza a este mismo mensaje (Nabel-Rosen y col. 2002).

SITIO WEB 5-15 **Mecanismos de traducción y degradación del mRNA (Mechanisms of mRNA translation and degradation).** La traducción es un proceso complejo que involucra la iniciación, elongación y terminación de la síntesis de proteínas. Ésta tiene numerosos puntos en los que se puede producir la regulación. Del mismo modo, la degradación del mRNA es un acontecimiento estrechamente regulado.

Inhibición selectiva de la traducción del mRNA

Algunos de los casos más destacables de regulación traduccional de la expresión de un gen tienen lugar en el ovocito. El ovocito a menudo produce y almacena mRNA que serán utilizados únicamente una vez producida la

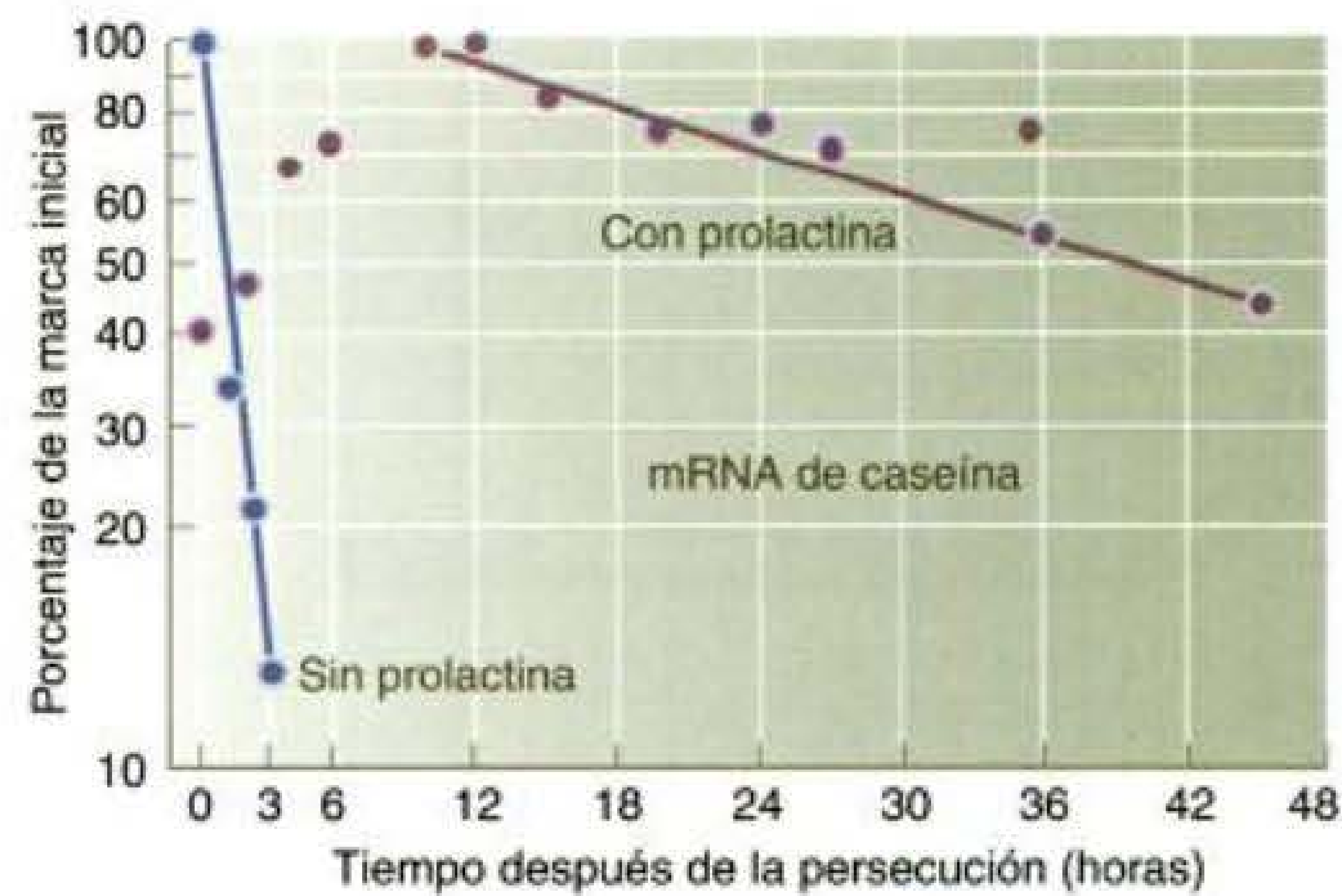


Fig. 5-31. Degradación del mRNA de caseína ante la presencia y ausencia de prolactina. A cultivos de células mamarias de rata se les administraron precursores de RNA radiactivo (pulso) y, después de un tiempo, fueron lavados y se les dieron precursores no radiactivos (persecución). Este procedimiento marcó el mRNA de caseína sintetizado durante el tiempo de pulso. El mRNA de caseína fue aislado luego a diferentes tiempos después de la persecución y se midieron sus marcas radiactivas. Ante la ausencia de prolactina, el mRNA de caseína marcado (p. ej., recientemente sintetizado) disminuyó rápidamente, con una vida media de 1,1 horas. Cuando el mismo experimento fue hecho en un medio conteniendo prolactina, la vida media se extendió a 28,5 horas. (Según Guyette y col. 1979.)

fecundación. Estos mensajeros se encuentran en un estado latente hasta que son activados mediante señales iónicas (discutidas en el capítulo 7) que se propagan a través del ovocito durante la ovulación o cuando se produce la unión del espermatozoide. El cuadro 5-2 muestra una lista parcial de mRNA que están almacenados en el citoplasma del ovocito. Algunos de estos mRNA almacenados codifican proteínas que serán necesarias durante la segmentación, cuando el embrión fabrique enormes cantidades de cromatina, membranas celulares y componentes del citoesqueleto. Algunos de estos mRNA codifican las proteínas ciclinas que regulan el tiempo de la división celular

Cuadro 5-3 *Algunos mRNA almacenados en el citoplasma del ovocito y traducidos en o cerca de la fecundación*

mRNA que codifican	*Función(es)*	*Organismo(s)*
Ciclinas	Regulación de la división celular	Erizo de mar, almeja, estrella de mar, rana
Actina	Movimiento y contracción celular	Ratón, estrella de mar
Tubulina	Formación de los husos mitóticos, cilios y flagelos	Almeja, ratón
Subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa	Síntesis de DNA	Erizo de mar, almeja, estrella de mar
Hipoxantina fosforrilbosil-transferasa	Síntesis de purina	Ratón
Vg1	Determinación mesodérmica (¿?)	Rana
Histonas	Formación de cromatina	Erizo de mar, rana, almeja
Cadherinas	Adhesión de las blastómeras	Rana
Metaloproteinasas	Implantación en el útero	Ratón
Factores de crecimiento	Crecimiento celular; crecimiento celular uterino (¿?)	Ratón
Factor FEM-3 de determinación del sexo	Formación de espermatozoides	*C. elegans*
Productos del gen PAR	Segregación de determinantes morfogenéticos	*C. elegans* *C. elegans*
Morfógeno SKN-1	Determinación del destino de las blastómeras	*Drosophila*
Morfógeno Hunchback	Determinación del destino anterior	*Drosophila*
Morfógeno caudal	Determinación del destino posterior	*Drosophila*
Morfógeno bicoid	Determinación del destino anterior	*Drosophila*
Morfógeno nanos	Determinación del destino posterior	*C. elegans*
Morfógeno GLP-1	Determinación del destino anterior	*Drosophila*
Proteínas menores de la célula germinal	Determinación de la célula germinal	*Drosophila*
Proteína Oskar	Localización de la célula germinal	*Drosophila*
Ornitina transcarbamilasa	Ciclo de la urea	Rana
Elongación del factor 1a	Síntesis de proteínas	Rana
Proteínas ribosómicas	Síntesis de proteínas	Rana, *Drosophila*

Fuente: Tomado de numerosas fuentes.

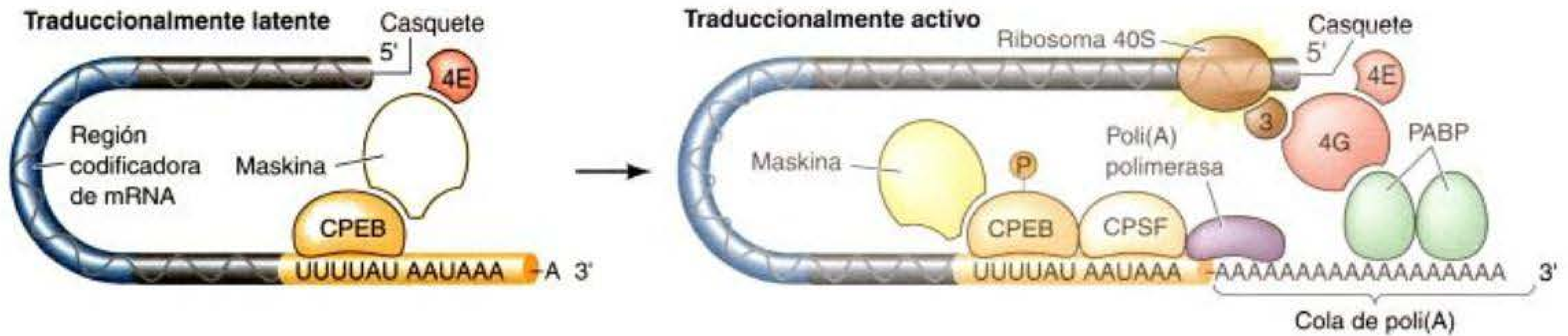


Fig. 5-32. Regulación traduccional en el ovocito de *Xenopus*. En el ovocito, los extremos 3' y 5' (grises) del mRNA son acercados por maskina, una proteína que une a CPEB en el extremo 3' y al factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E) sobre el extremo 5'. Las maskinas bloquean el comienzo de la traducción al impedir que eIF4E se una a eIF4G. Se produce el estímulo de la progesterona durante la ovulación. CPEB es fosforilada y puede unir CPSF. CPSF puede unir poli(A) polimerasa y dar comienzo al crecimiento de la cola de poli(A). La proteína que une poli(A) (PABP) puede unirse a su cola y luego unir eIF4G de manera estable. A continuación, este factor de iniciación puede unir eIF4E y, mediante esta asociación con eIF3, posicionar una subunidad ribosomal 40S sobre el mRNA. (Según Mendez y Richter 2001.)

temprana (Rosenthal y col. 1980; Standart y col. 1986). A su vez, en muchas especies (incluidos el erizo de mar y *Drosophila*), el mantenimiento del patrón y porcentaje normales de divisiones celulares no requiere un núcleo; en su lugar, ésta requiere una continua síntesis de proteínas a partir de los mRNA maternos almacenados (Wagenaar y Mazia 1978; Edgar y col. 1989). Otros mensajes almacenados codifican proteínas que determinan los destinos celulares. Éstos incluyen a los mensajeros de *bicoid* y *nanos* que proporcionan información posicional en el embrión de *Drosophila*, como se vio en el capítulo 3, y el mRNA *glp*-1 del nematodo *C. elegans*.

SITIO WEB 5-16 **El descubrimiento de mRNA almacenados (The discovery of stored mRNAs).** La existencia de transcriptos de mRNA almacenados maternamente en el ovocito fue uno de los primeros descubrimientos de la embriología molecular. Aún antes que el clonado de los genes llegara a ser viable, la identidad de varios de estos mRNA era conocida.

El casquete 5' y la región sin traducir 3' (UTR) parecen especialmente importantes en la regulación de la accesibilidad del mRNA a los ribosomas. Si el casquete 5' no es producido o si el 3' UTR carece de una cola de poliadenilato, el mensajero probablemente no será traducido. Los ovocitos de muchas especies han "utilizado estos extremos como medios" para regular la traducción de mRNA. Por ejemplo, el ovocito de la polilla del gusano del cuerno del tabaco produce algunos de sus mRNA sin sus casquetes 5' metilados. En este estado, ellos no pueden ser traducidos eficientemente. Sin embargo, en la fecundación, una metiltransferasa completa la formación de los casquetes, y estos mRNA pueden ser traducidos (Kastern y col. 1982).

En aquellos ovocitos, que tienen una cola de poli(A) corta no se llega a la degradación del mensajero; sin embargo, tales mensajeros no son traducidos. En el ovocito de *Drosophila*, el mensajero *bicoid* se mantiene sin traducir hasta que las señales de fecundación le permiten a las proteínas Cortex (corteza) y Grauzone agregar los residuos poli(A) al mRNA de *bicoid* (Sallés y col. 1994; Lieberfarb y col. 1996). En este punto, el mensajero *bicoid* llega a ser traducible (y su producto determina qué parte del embrión se convierte en la cabeza y qué parte en el tórax).

En los ovocitos de anfibio, los extremos 5' y 3' de muchos mRNA son amarrados conjuntamente por una proteína denominada **maskina** (Stebbins-Boaz y col. 1999; Mendez y Richter 2001). La maskina une los extremos 5' y 3' en un círculo mediante la unión a otras dos proteínas, cada una en un extremo opuesto del mensajero. En primer lugar, ésta une a la proteína CPEB agregada a la secuencia UUUUAU en el 3' UTR; en segundo lugar, la maskina se une al factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) que está unido a la secuencia del casquete (fig. 5-32A). En esta configuración, el mRNA no puede ser traducido. Se piensa que la unión del eIF4E a la maskina previene la unión del eIF4E al factor de iniciación 4G (eIF4G), un factor de iniciación de la traducción críticamente importante que atrae a la subunidad ribosómico pequeña al mRNA.

Mendez y Richter (2001) han propuesto un escenario complicado para explicar cómo los mRNA unidos por maskina llegan a ser traducidos cerca del momento de la fecundación (fig. 5-32B). Durante la ovulación (cuando la hormona progesterona estimula las últimas divisiones meióticas del ovocito y el ovocito es liberado para la fecundación), una cinasa activada por la progesterona fosforila la proteína CPEB. La CPEB fosforilada puede ahora unirse a CPSF (del inglés: *cleavage and poliadenylation specificity factor*), el factor de especificidad para la segmentación y la poliadenilación (Mendez y col. 2000; Hodgman y col. 2001). La unión de la proteína CPSF tiene lugar sobre una secuencia particular del 3' UTR que se ha demostrado ser crítica para la poliadenilación, y para estos complejos con la poli(A) polimerasa que elongan la cola de poli(A) del mRNA. Una vez que la cola de poli(A) es extendida, las proteínas que se unen a las moléculas de poli(A) (PABP-del inglés: *poli (A) binding protein*) pueden adjuntarse a la cola en crecimiento. Las proteínas PABP estabilizan a eIF4G, permitiéndole a éste dejar fuera de competencia a la maskina por el sitio de

unión sobre la proteína eIF4E en el extremo 5' del mRNA. A continuación la proteína eIF4G puede unirse a la proteína 3 iniciadora de la traducción (eIF3), que puede colocar la subunidad ribosómico pequeña sobre el mRNA. La subunidad ribosomal pequeña (40S) encontrará luego al complejo tRNA iniciador, con la subunidad ribosómica mayor y dará comienzo a la traducción.

En algunos ejemplos, se impide la traducción de los mensajeros en el ovocito mediante la unión de algunas proteínas inhibitorias específicas. Por ejemplo, la proteína Smaug se une al 3'UTR del mensajero *nanos* de *Drosophila*, y esta unión evita en el ovocito la traducción del mRNA *nanos* hasta que se produzca la fecundación (Smibert y col. 1996). (En este momento, la proteína Nanos llegará a ser crítica para determinar qué partes de la mosca serán su abdomen.)

Uno de los modos más destacables de regulación de la traducción de un mensajero específico se observa en *Caenorhabditis elegans*. Este nematodo hace honor a su nombre, desarrollando una solución particularmente elegante al problema de controlar la expresión larval del gen (Lee y col. 1993; Wightman y col. 1993). Lleva a cabo naturalmente la producción de un mRNA antisentido para uno de sus propios mensajes. Altos niveles del factor de transcripción LIN-14 son importantes en el desarrollo de los órganos larvales tempranos. A partir de entonces, la proteína LIN-14 no se ve por más tiempo, aunque los mensajeros de *lin-14* pueden ser detectados a través del desarrollo. *C. elegans* es capaz de inhibir la síntesis de LIN-14 a partir de estos mensajeros mediante la activación del gen *lin-4*. El gen *lin-4* no codifica una proteína. En su lugar, codifica dos RNA pequeños (el más abundante tiene 25 nucleótidos de longitud, el otro continúa por unos 40 nucleótidos más) que son complementarios con un sitio imperfectamente repetido en el *lin-14* 3' UTR. La figura 5-33 muestra un bosquejo hipotético de lo que podría estar sucediendo. Parece que la unión de los transcriptos *lin-4* al 3´ UTR del mRNA de *lin-14* no indica la destrucción del mensajero, en su lugar impide que el mensaje sea traducido.

Ahora se piensa que el RNA *lin-4* es un miembro de un grupo muy grande de **RNA regulatorios pequeños** (a veces denominados **"micro-RNA"**). Estos RNA son producidos a partir de precursores más largos y son procesados por la enzima Dicer (la misma enzima utilizada en la técnica de interferencia del RNA; véase cap. 4). Tales RNA regulatorios pequeños pueden unirse al 3'UTR de los mensajeros e inhibir su traducción. En muchos ejemplos, estos mensajeros son estabilizados, sin ser degradados por esta unión (Grosshans y Slack 2002). La abundancia de estos micro-RNA y su aparente conservación entre las moscas, nematodos y vertebrados sugiere que tal regulación del RNA era un medio previamente desconocido pero potencialmente muy importante en la regulación de la expresión del gen (Lagos-Quintana y col. 2001; Lau y col. 2001; Lee y Ambros 2001).

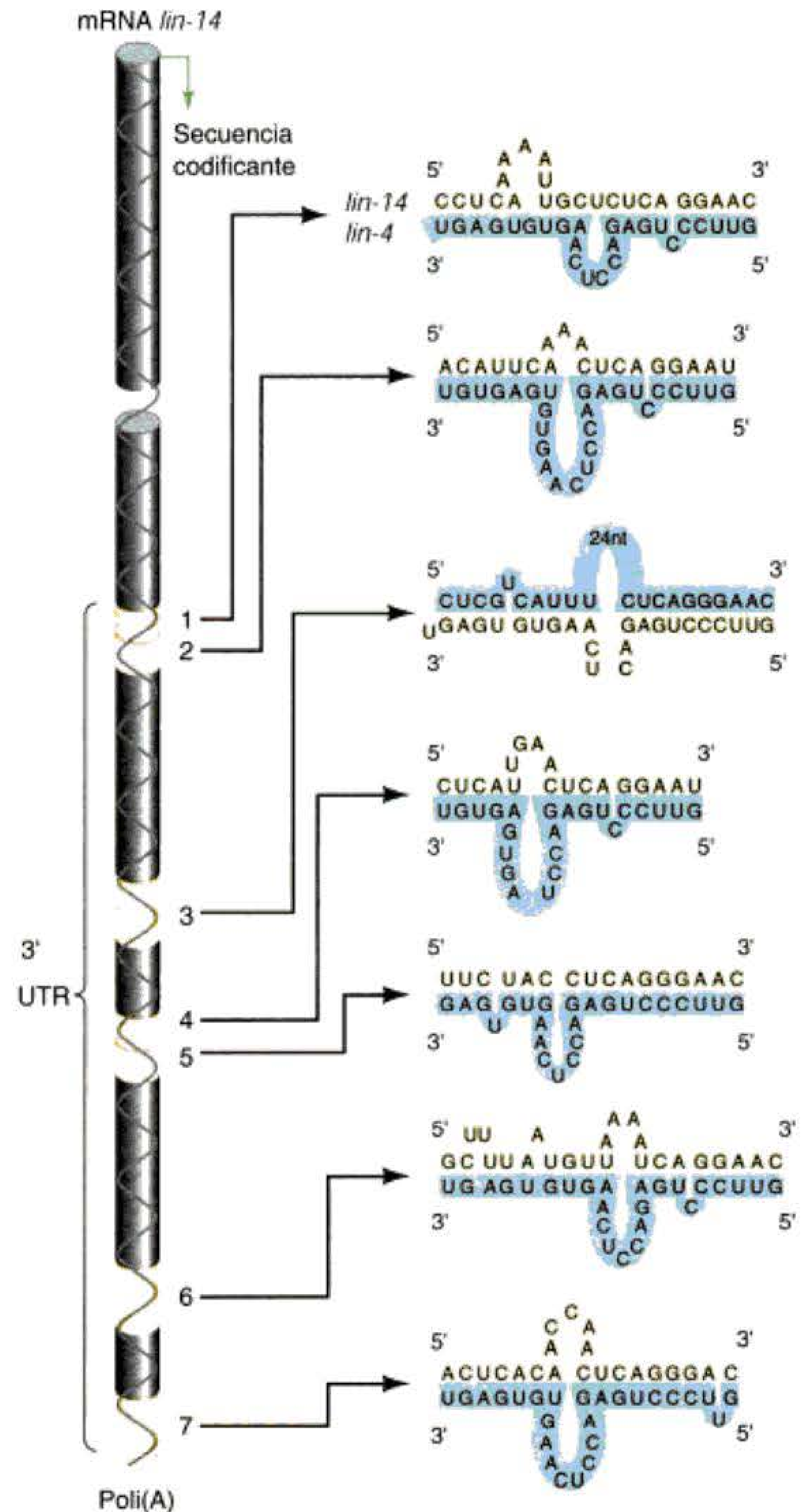


Fig. 5-33. Modelo hipotético de la regulación de la traducción del mRNA *lin-14* mediante RNA *lin-4*. El gen *lin-4* no produce un mRNA. En su lugar, produce RNA pequeños que son complementarios a secuencias repetidas en el 3' UTR del mRNA de *lin-14*, que se une a éste e impide su traducción. (Según Wickens y Takayama 1995.)

Control de la expresión del RNA mediante localización citoplasmática

No solo es regulado el tiempo de traducción del mRNA, sino también el lugar de expresión del RNA. Así como en la represión selectiva de la traducción del mRNA, la localización selectiva de los mensajeros es a menudo llevada a cabo a través de sus 3' UTR, y es llevada a cabo frecuentemente en el ovocito. Rebagliati y col. (1985) demostraron que hay ciertos mRNA en los ovocitos de *Xenopus* que son transportados selectivamente al polo vegetal (fig. 5-34). Después de la fecundación, estos mensajeros producen proteínas que son encontradas únicamente en las blastómeras vegetales. En *Drosophila*, los mensajeros *bicoid* y *nanos* están localizados en diferentes extremos del ovocito. El 3' UTR del mRNA de *bicoid* le permite a este mensajero unirse a los microtúbulos a través de su asociación con otras dos proteínas (Swallow y Staufen). Si el 3' UTR de *bicoid* es unido a algún otro mensajero, este mRNA también será adicionado al polo anterior del ovocito (Driever y Nüsslein-

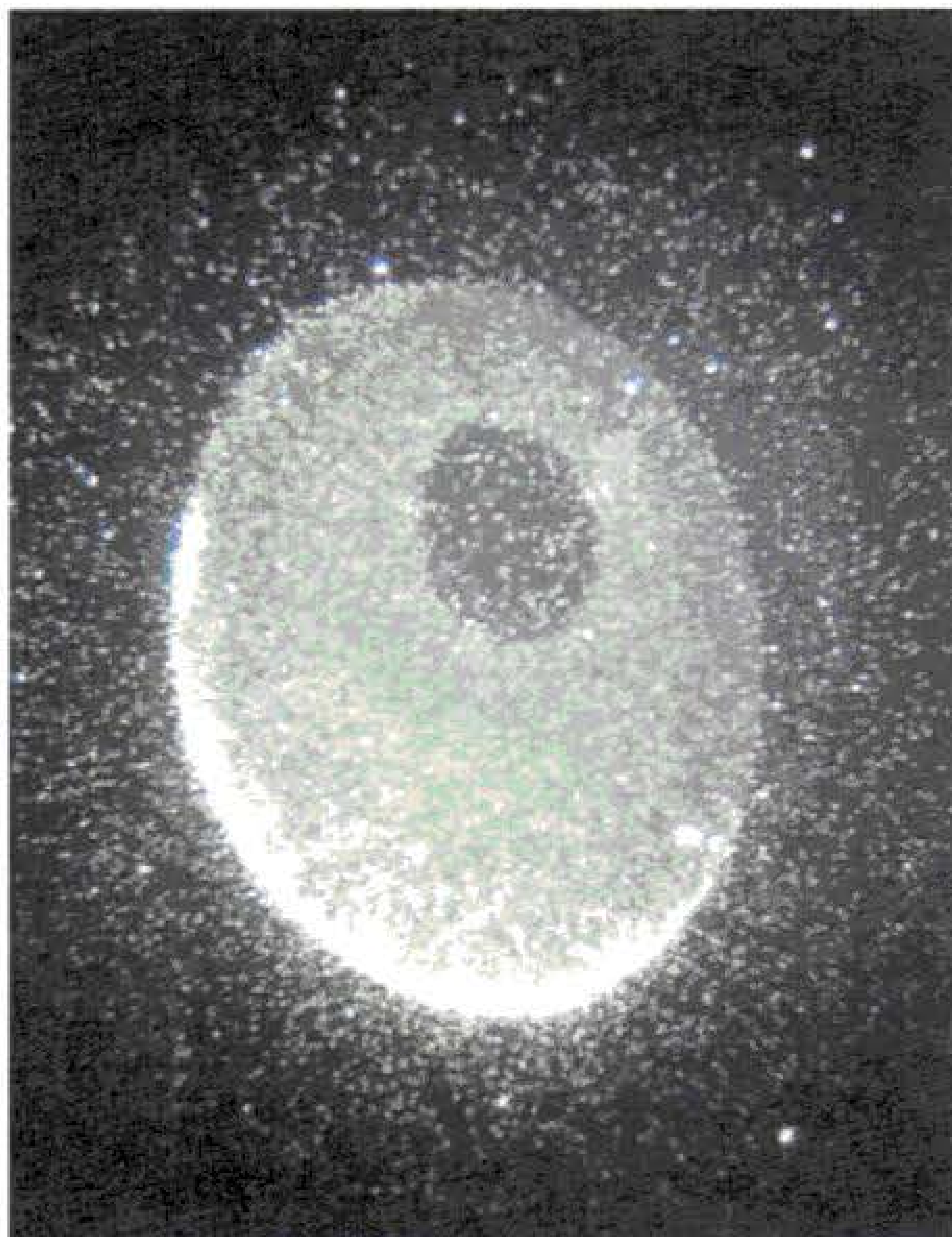


Fig. 5-34. Localización del mRNA *Vg1* en la porción vegetal del ovocito de *Xenopus*. La medialuna blanca en la parte inferior del ovocito representa al mensajero *Vg1* amarrado. El área negra corresponde al núcleo haploide del ovocito. En la fecundación, el mensajero *Vg1* es traducido a una proteína inactiva. Si esta proteína es procesada a su forma activa, puede llegar a ser una proteína señalizadora importante en el embrión. (Fotografía cortesía de D. Melton.)

Volhard 1988 a,b; Ferrandon y col. 1994). El 3' UTR del mensajero de *nanos* permite del mismo modo su acumulación en el polo posterior del ovocito (Gavis y Lehmann 1994). Como se vio en el capítulo 3, esta localización le permite a la proteína Bicoid formar un gradiente en el que las concentraciones más altas de éste están en su polo anterior, mientras que la proteína Nanos forma un gradiente con su pico en el polo posterior (véase fig. 3-25). El porcentaje de estas dos proteínas determinará finalmente el eje anteroposterior del embrión y del adulto de *Drosophila*. (La capacidad de las células para ser especificadas por gradientes de proteínas es un fenómeno crítico y se discute en más detalle en los capítulos 3 y 9.)

SITIO WEB 5-17 **Otros ejemplos de regulación traduccional de la expresión de un gen (Others examples of translational regulation of gene expression).** Hay otros numerosos ejemplos fascinantes en los que el mRNA es traducido selectivamente bajo diferentes condiciones. El cociente 1:1 de las globinas α y β en la sangre del adulto se produce debido a la traducción diferencial de los mensajeros de las respectivas globinas. La producción del hemo por la globina también es regulada a nivel de la traducción.

Regulación postraduccional de la expresión del gen

Cuando una proteína es sintetizada, la historia todavía no finaliza (fig. 5-35). Una vez que una proteína es producida llega a ser parte de un nivel mayor de organización. Por ejemplo, ésta puede convertirse en el armazón estructural de la célula, o puede llegar a estar involucrada en una miríada de caminos enzimáticos para la síntesis o la degradación de metabolitos celulares. En cualquier caso, la proteína individual es ahora parte de un "ecosistema" complejo que la integra en una relación con otras numerosas proteínas. Por lo tanto, todavía pueden tener lugar varios cambios que determinan si la proteína será o no activa.

Algunas proteínas recién sintetizadas son inactivas al no producirse la segmentación de ciertas secciones inhibitorias distantes. Esto es lo que sucede cuando la insulina es producida a partir de su precursor proteico de mayor tamaño. Algunas proteínas deben ser "dirigidas" a sus destinos intracelulares específicos en relación a su función. Las proteínas frecuentemente están secuestradas en ciertas regiones de la célula, como las membranas, lisosomas, núcleos o mitocondrias. Algunas proteínas necesitan ensamblarse con otras proteínas con la finalidad de formar una unidad funcional. La proteína hemoglobina, el microtúbulo y el ribosoma constituyen ejemplos de numerosas proteínas unidas para formar una unidad funcional. Y algunas proteínas no son activas a menos que ellas unan un ión (como Ca^{2+}), o sean modificadas por el agregado covalente de un grupo fosfato o acetato. Este último tipo de modificación de proteína llegará a ser muy importante en el siguiente capítulo, debido a que muchas proteínas importantes en las células embrionarias se sitúan justo allí hasta que alguna señal las activa. Se especula alrededor de cómo el embrión se desarrolla mediante la activación de ciertas proteínas en células específicas.

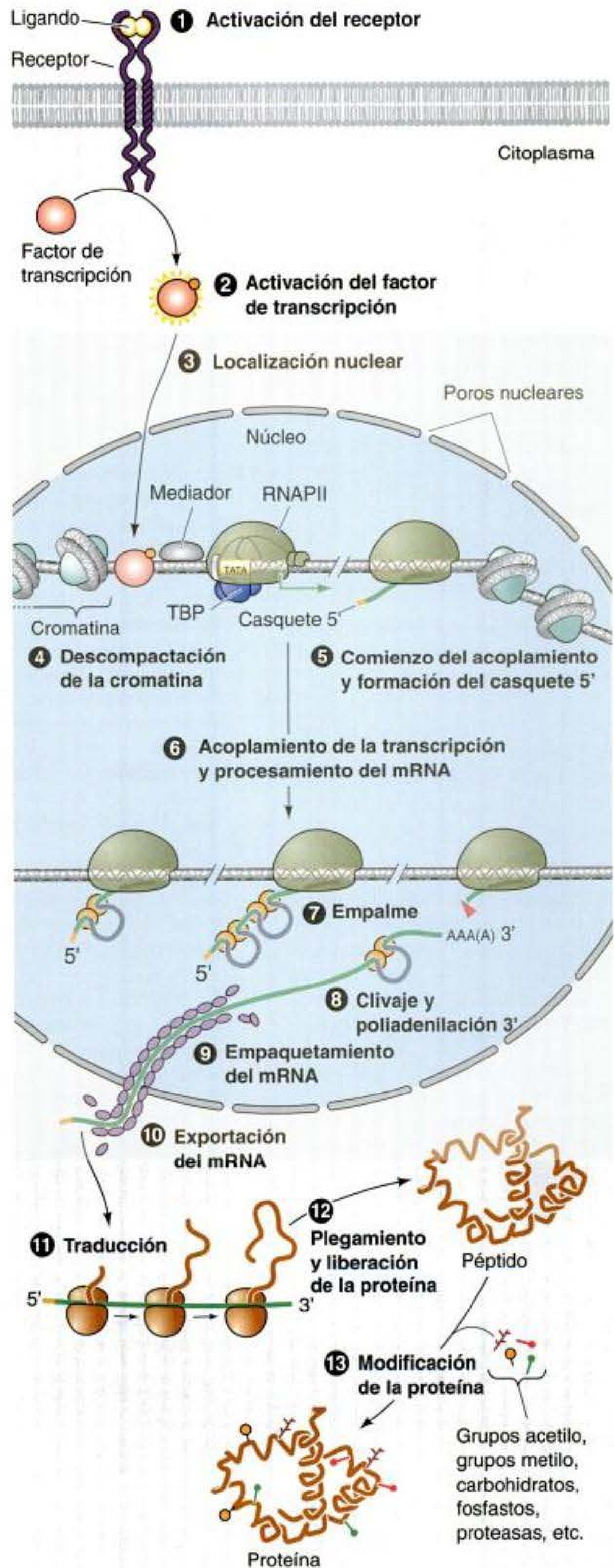


Fig. 5-35. Explicación integrada de la expresión de un gen. Cada etapa de regulación de la expresión de un gen es una subdivisión de un proceso continuo desde la transcripción hasta la modificación de la proteína. La activación de los factores de transcripción mediante receptores de membrana será el tema del capitulo siguiente. (Según Orphanides y Reinberg 2002.)

Principios de desarrollo: expresión génica diferencial

1. La expresión génica diferencial de núcleos genéticamente idénticos crea diferentes tipos celulares. La expresión génica diferencial puede producirse a niveles de la transcripción del gen, del procesamiento del RNA nuclear, de la traducción del mRNA y de la modificación proteica. Observe que el procesamiento y exportación del RNA se producen mientras el RNA está todavía siendo transcripto a partir del gen.

2. Los genes son generalmente reprimidos, y la activación de un gen a menudo implica la inhibición de su represor. Este hecho lleva a pensar en dobles y triples negativos: la activación es a menudo la inhibición de un inhibidor; la represión es la inhibición del inhibidor del inhibidor.

3. Los genes eucarióticos contienen secuencias promotoras a las que se puede unir la RNA polimerasa para iniciar la transcripción. Para llevar a cabo esto, las RNA polimerasa eucarióticas están unidas por una serie de proteínas denominadas factores de transcripción basal.

4. Los genes eucarióticos expresados en tipos celulares específicos contienen secuencias potenciadoras que regulan su transcripción en tiempo y espacio.

5. Factores de transcripción específicos pueden reconocer secuencias específicas de DNA en el promotor y en las regiones potenciadoras. Estas proteínas activan o reprimen la transcripción de los genes a los que se han unido.

6. Los potenciadores funcionan de un modo combinatorio. La unión de varios factores de transcripción puede actuar para potenciar o inhibir la transcripción de un cierto promotor. En algunos casos la transcripción es activada solamente si el factor A y el factor B están presentes, mientras que en otros casos, la transcripción es activada si el factor A o el factor B está presente.

7. Un gen que codifica un factor de transcripción puede automantenerse activado si el factor de transcripción que codifica activa también a su propio promotor. Por lo tanto, el gen de un factor de transcripción puede tener un grupo de secuencias potenciadoras para dar comienzo a su activación y un segundo grupo de secuencias potenciadoras (que se unen al factor de transcripción codificado) para mantener su activación.

8. A menudo, los mismos factores de transcripción que son utilizados durante la diferenciación de un tipo celular particular son también utilizados para activar los genes de aquellos productos específicos de tipo celular.

9. Los potenciadores pueden actuar como silenciadores para suprimir la transcripción de un gen en tipos celulares inapropiados.

10. Los factores de transcripción actúan de diferentes modos para regular la síntesis del RNA. Algunos factores de transcripción estabilizan la RNA polimerasa uniéndose al DNA, algunos perturban a los nucleosomas, incrementando la eficiencia de la transcripción.

11. La transcripción se correlaciona con una falta de metilación sobre las regiones potenciadora y promotora de los genes. Diferencias de metilación pueden dar cuenta de ejemplos de impronta genómica, en las que un gen transmitido a través del espermatozoide es expresado de modo diferente en relación al mismo gen transmitido a través del ovocito.

12. La compensación de la dosis permite a los derivados del cromosoma X de los machos (que tienen un cromosoma X por célula en las moscas de la fruta y en los mamíferos) igualar los productos derivados del cromosoma X de las hembras (que tienen dos cromosomas X por célula). Esta compensación es llevada a cabo a nivel de la transcripción, mediante la aceleración de la transcripción del cromosoma X solitario en los machos (*Drosophila*) o mediante la inactivación de grandes porciones de uno de los dos cromosomas en las hembras (mamíferos).

13. La inactivación del cromosoma X en mamíferos es generalmente al azar e involucra la activación del gen *Xist* sobre el cromosoma que será inactivado.

14. La selección diferencial de RNA nuclear puede permitir a ciertos transcriptos entrar al citoplasma y ser traducidos mientras se impide a otros transcriptos que abandonen el núcleo.

15. El empalme diferencial de RNA puede crear una familia de proteínas relacionadas al provocar que las diferentes regiones del nRNA sean leídas como exones e intrones. Lo que es un exón en un grupo de circunstancias puede ser un intrón en otras.

16. Algunos mensajeros son traducidos solamente en ciertos momentos. El ovocito, en particular, utiliza la regulación traduccional para poner a un lado ciertos mensajeros que son transcriptos durante el desarrollo del ovocito pero utilizados únicamente después de la fecundación del gameto femenino. Esta activación es a menudo llevada a cabo mediante la eliminación de proteínas inhibitorias o por la poliadenilación del mensajero.

17. Muchos RNA mensajeros están localizados en regiones particulares del ovocito o de otras células. Esta localización parece ser regulada mediante la región 3' sin traducir del mRNA.

Bibliografía citada

Akhtar, A., D. Zink and P. B. Becker. 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. Nature 407: 405-409.

Andersen, F. G., J. Jensen, R. S. Heller, H. V. Petersen, L.-I. Larsson, O. D. Madsen and P. Serup. 1999. Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. FEBS Lett. 445: 315-320.

Angier, N. 1992. A first step in putting genes into action: Bend the DNA. New York Times, Aug. 4, Cl , C7.

Arney, K. L., S. Erhardt, R. A. Drewell and M. A. Surani. 2001. Epigenetic reprogramming of the genome: From the germ line to the embryo and back again. Int. J. Dev. Biol. 45: 533-540.

Baek, H. J., S. Malik, J. Qin and R. G. Roeder. 2002. The requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF_{II}s. Mol. Cell Biol. 22: 2842-2852.

Baker, B., R. N. Nagoshi and K. C. Burtin. 1987. Molecular genetic aspects of sex determination in Drosophila. BioEssays 6: 66-70.

Barlow, D. P., R. Stoger, B. G. Herrmann, K. Saito and N. Schweifer. 1991. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. Nature 349: 84-87.

Barr, M. L. and E. G. Bertram. 1949. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature 163: 676.

Bartolomei, M. S. and S. M. Tilghman. 1997. Genomic imprinting in mammals. Annu. Rev. Genet. 31: 493-525.

Beimesche, S. and 8 others. 1999. Tissue-specific transcriptional activity of a pancreatic islet cell-specific enhancer sequence/Pax6 binding site determined in normal adult tissues in vivo using transgnic mice. Mol. Endocrinol. 13: 718-728.

Bell, A. C., A. G. West and G. Felsenfeld. 2001. Insulators and boundaries: Versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. Science 291: 447-450.

Belote, J. M., M. McKeown, R. T. Boggs, R. Ohkawa and B. A. Sosnowski. 1989. Molecular genetics of transformer, a genetic switch controlling sexual differentiation in Drosophila Dev. Genet. 10: 143-155.

Bentiey, N. J., T. Eisen and C. R. Goding. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and the role of the initiator. Mol. Cell. Biol. 14: 7996-8006.

Bestor, T. H. and V. M. Ingram. 1983. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: Purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.SA 82: 2674-2678.

Borsani, G. and 13 others. 1991. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. Nature 351: 325-329.

Breitbart R. A., A. Andreadis and B. Nadal-Ginard. ;987. Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem. 56: 481-495.

Brockdorrf, N. and 7 others. 1992. The product of the mouse Xist gene is a 15-kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. Cell 71: 515-526.

Brown, C. J. and H. F. Willard.1994. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. Nature 368: 154-156.

Brown, C. J., A. Ballabio, J. L. Rupert, R. G. Lafreniere, M. Grompe, R. Tonlorenzi and H. F. Willard. 1991a. A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 349: 38-45.

Brown, C. J. and 9 others.1991b. Localization of the X chromosome inactivation center on the human X chromosome. Nature 349: 82-85.

Brown, C. J., B. D. Hendrich, J. L. Rupert, R. G. Lafreniere, Y. Xing, J. Lawrence and H. F. Willard. 1992. The human XIST gene: Analysis of a 17-kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell 71: 527-542.

Brown, C. J., L. Carrel and H. F. Willard. 1997. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. Am. J. Hum. Genet. 60: 1333-1343.

Buratowski, S. 1997. Multiple TATA-binding factors come back into style. Cell 91: 13-15.

Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente and P. A. Sharp. 1989. Five initiation complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. Cell 56: 549-561.

Busslinger, M., J. Hurst and R. A. Flavell. 1983. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. Cell 34: 197-206.

Celotto, A. M. and B. R. Graveley. 2001. Alternative splicing of the Drosophila Dscam premRNA is both temporally and spatially regulated. Genetics 159: 599-608.

Centerwall, W. R. and K. Benirschke. 1973. Male tortoiseshell and calico (T-C) cats. J. Hered. 64: 272-278.

Chaillet, J. R., T. F. Vogt, D. R. Beier and P. Leder. 1991. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. Cell 66: 77-83.

Chen, J.-L., L. D. Attardi, C. P. Verrijzer, K. Yokomori and R. Tjian. 1995. Assembly of recombinant TFIID reveals differential cofactor requirements for distinct transcriptional activators. Cell 79: 93-105.

Chong, J. A. and 9 others. 1995. REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. Cell 80: 949-957.

Chou, R. L., C. R. Altmann, R. A. Lang and A. Hemmati-Brivanlou. 1999. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. Development 126: 4213-4222.

Chou, W., K. D. Huynh, R. J. Spencer, L. S. Davidow and J. T. Lee. 2002. CTCF, a candidate Trans-acting factor for X-inactivation choice. Science 295: 345-347.

Cline, T. 1986. A female-specific lethal lesion in an X-linked positive regulator of the Drosophila sex determination gene, Sex-lethal. Genetics 113: 641-663.

Coschigano, K. T. and P. Wensink. 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of Drosophila. Genes Dev. 7: 42-55.

Croft, L., S. Schandorff, F. Clark, K. Burrage, P. Arctander and J. S. Mattick. 2000. ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alter-

native splicing in the human genome. Nature Genet. 24: 340-341.

Cvekl, A. and J. Piatigorsky. 1996. Lens development and crystallin gene expression: Many roles for Pax-6. BioEssays 18: 621-630.

Cvekl, A., C. M. Sax, X. Li, J. B. McDermott and J. Piatigorsky. 1995. Pax-6 and lens-specifit transcription of the chicken δl-crystallin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4681-4685.

DeChiara, T. M., E. J. Robertson and A. Efstratiadis. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. Cell 64: 849-859.

Decker, C. J. and R. Parker. 1995. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. Trends Biochem. 19: 336-340.

Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1988a. The bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner. Cell 54: 95-105.

Driever, W. and C. Nüsslein-Vohard. 1988b. A gradient of bicoid protein in Drosophila. Cell 54: 83-93.

Driscoll, D. J. and B. R. Migeon. 1990. Sex difference in methylation of single-copy genes in human meiotic germ cells: Implications for X chromosome inactivation, parental imprinting, and the origin of PGC mutations. Somat. Cell. Mol. Genet. 16: 267-268.

Edgar, B., F. Sprenger, R. J. Duronio, P. Leopold and P. O'Farrell. 1994. MPF regulation during the embryonic cell cycles of Drosophila. Genes Dev. 8: 440-453.

Epstein, J., T. Cai, T. Glaser, L. Jepeal and R. Maas. 1994. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. J. Biol. Chem. 269: 8355-8361.

Ferguson-Smith, A. C. and A. M. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. Science 293: 1086-1089.

Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nusslein-Volhard and D. St. Johnston. 1994. Staufen protein associates with the 3' UTR of bicoid to form particles that move in a microtubule-dependent manner. Cell 79: 1221-1232.

Ferré-D'Amaré, A. R, G. C. Predergast, E. B. Ziff and S. K. Burley. 1993. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric bHLH/Z domain. Nature 363: 38-45.

Gagnon, M. L., L. M. Angerer and R. C. Angerer. 1992. Posttranscriptional regulation of ectoderm-specific gene expression in early sea urchin embryos. Development 114: 457-467.

Gartler, S. M., R. M. Liskay and N. Grant. 1973. Two functional X chromosomes in human fetal oocytes. Exp. Cell Res. 82: 464-466.

Gavis, E. R. and R. Lehmann. 1994. Translational regulation of nanos by RNA localization. Nature 369: 315-318.

Gedamu, L. and G. H. Dixon. 1978. Effect of enzymatic decapping on protamine messenger RNA translation in wheat-germ S-30. Biochem. Biophys. Res. Comm. 85: 114-125.

Glaser, T., L. Jepeal, J. G. Edwards, S. R. Young, J. Favor and R. L. Maas. 1994. PAX6 gene dosage effects in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia, and central nervous system defects. Nature Genet. 8: 463-471.

Grosshans, H. and F. J. Slack. 2002. Micro-RNAs: Small is plentiful. J. Cell Biol. 156: 17-21.

Groudine, M. and H. Weintraub. 1981. Activation of globin genes during chick development. Cell 24: 393-401.

Gruenbaum, Y., H. Ceder and A. Razin. 1982. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. Nature 295: 620-622.

Guyette, W. A., R. J. Matusik and J. M. Rosen. 1979. Prolanin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. Cell 17: 1013-1023.

Halder, G., P. Callaerts and W. J. Gehring. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. Science 267: 1788-1792.

Hammes, A. and 7 others. 2001. The splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. Cell 106: 319-329.

Hastie, N. D. 2001. Life, sex, and WT 1 isoforms: Three amino acids can make all the difference. Cell 106: 391-394.

Heard, E., C. Rougeulle, D. Arnaud, P. Avner, C. D. Allis and D. L. Spector. 2001. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. Cell 107: 727-738.

Hemesath, T. J. and 9 others. 1994. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev. 8: 2770-2780.

Hodgman, R., J. Tay, R. Mendez and J. D. Richter. 2001. CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAKI/Eg2 in maturing mouse oocytes. Development 128: 2815-2822.

Horowitz, D. S. and A. R. Krainer. 1995. Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammálian pre-mRNA splicing. Trends Genet. 10: 100-106.

Hotchkiss, R. D. 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J. Biol. Chem. 175:315-332.

Hui, H. and R. Perfetti 2002. Pancreas duodenum homeobox-l regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. Eur. J. Endocrinol. 146: 129-141.

Hussain, M. A. and J.-F. Habener. 1999. Glucagon gene transcription activation mediated by synergistic interactions of Pax6 and Cdx2 with the p300 co-activator. J. Biol. Chem. 274: 28950-28957.

Ichtchenko, K., Y. Hata, T. Nguyen, B. Ullrich, M. Missler, C. Moomaw and T. C. Südhof, 1995. Neuroglian 1: A splice-site specific ligand for β-neurexins. Cell 81: 435-443.

Jeppesen, P. and B. M. Turner. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. Cell 74: 281-289.

Jepson, K. and 14 others. 2000. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. Cell 102: 753-763.

Jiang, Y.-H., T.-F. Tsai, J. Bressler and A. L. Beaudet. 1998. Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 334-342.

Jones, P. L. and 7 others. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nature Genet. 19: 187-191.

Jursnich, V. A. and K. C. Burtis. 1993. A positive role in differentiation of the male doublesex protein of Drosophila. Dev. Biol. 155: 235-249.

Kafri, T. and 7 others. 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. Genes Dev. 6: 705-715.

Kallunki, P., S. Jenkinson, G. M. Edelman and F. S. Jones. 1995. Silencer elements modulate the expression of the gene for neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM. 1. Biol. Chem. 270: 21291-21298.

Kallunki, P., G. M. Edelman and F. S. Jones. 1997. Tissue-specific expression of the Ll cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. J. Cell. Biol. 138: 1343-1355.

Kamachi, Y., M. Uchikawa, J. Collignon, R. Lovell-Badge and H. Kondoh. 1998. Involvement of Sox1, 2, and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. Development 125: 2521-2532.

Kammandel, B., K. Chowdhury, A. Stoykova, S. Aparicio, S. Brenner and P. Gruss. 1998. Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of Pax6 gene activity. Dev. Biol. 205: 797.

Kastern, W. H., M. Swindlehurst, C. Aaron, J. Hooper and S. J. Berry. 1982. Control of mRNA translation in oocytes and developing embryos of giant moths. 1. Functions of the 5' terminal "cap" in the tobacco hornworm Manduca sexta. Dev. Biol. 89: 437-449.

Kawahara, A., C. B. Chien and 1. B. Dawid.2002. The homeobox gene mbx is involved in eye and tectum development. Dev. Biol. 248: 107-117.

Kay, G. F., G. D. Penny, D. Patel, A. Ashworth, N. Brockdorff and S. Rastan. 1993. Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. Cell 72: 171-182.

Keith, D. H., J. Singersam and A. D. Riggs. 1986. Active X-chromosome DNA is unmethylated at eight CCGG sites dustered in a guanine-plus-cytosine-rich island at the 5' end of the gene for phosphoglycerate kinase. Mol. Cell Biol. 6: 4122-4125.

Keshet, 1., J. Lieman-Hurwitz and H. Cedar. 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. Cell 44: 535-543.

Kleene, K. C. and T. Humphreys. 1977. Similarity of hnRNA sequences in blastula and pluteus stage sea urchin embryos. Cell 12: 143-155.

Kleene, K. C. and T. Humphreys. 1985. Transcription of similar sets of rare maternal RNAs and rare nuclear RNAs in sea urchin blastulae and adult coelomocytes. J. Embryol. Exp. Morphol. 85: 131-149.

Knoll, J. H. M., R. D. Nicholls, R. E. Magenis, J. M. Graham, Jr., M. Lalande and S. A. Latt. 1989. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in the parental origin of the deletion. Am. J. Med. Genet. 32: 285-290.

Kornberg, R. D. and J. D. Thomas. 1974. Chromatin structure: Oligomers of histones. Science 184: 865-868.

Kwan, K.-M. 2002. Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. genesis 32: 49-62.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl. 2001. Coding for small expressed RNAs. Science 294: 853-858.

Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein and D. P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science 294: 858-862.

Lawn, R. M., A. Efstratiadis, C. O'Connell and T. Maniatis. 1980. The nucleotide sequence of the human β-globin gene. Cell 21: 647-651.

Lee, J. T. 2000. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects of Tsix. Cell 103: 17-27.

Lee, J. T. and N. Lu. 1999. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. Cell 99: 47-57.

Lee, J. T., W. M. Strauss, J. A. Dausman and R. Jaenisch. 1996. A 450-kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. Cell 86: 83-95.

Lee, R. C. and V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science 294: 862-864.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros. 1993. The C. elegans heterochromatic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75: 843-855.

Lee, T. I. and R. A. Young. 1998. Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. Genes Dev. 12: 1398-1408.

Lieberfarb, M. E., T. Chu, C. Wreden, W. Theurhuf, J. P. Gergen and S. Strickland. 1996. Mutations that perturb poly(A)-dependent maternal mRNA activation block the initiation of development. Development 122: 579-588.

Litt, M. D., M. Simpson, M. Gaszner, C. D. Allis and G. Felsenfeld.2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken -globin locus. Science 293: 2453-2455.

Lucchesi, J. C. and J. E. Manning. 1987. Gene dosage and compensation in Drosophila melanogaster. Adv. Genet. 24: 371-429.

Luger, R., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 ,4 resolution. Nature 389: 251-260.

Luo, M. L., Z. Zhou, K. Magni, C. Christoforides, J. Rappsilber, M. Mann and R. Reed. 2001. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. Nature 413: 644-647.

Lyon, M. F. 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature 190: 372-373.

MacDougall, C., D. Harbison and M. Bownes. 1995. The developmental consequences of alternative splicing in sex determination and differentiation in Drosophila. Deu Biol. 172: 353-376.

Maniatis, T., S. Goodbourn and J. A. Fischer, 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science 236: 1237-1245.

Marahrens, Y., J. Loring and R. Jaenisch. 1998. Rok of the Xist gene in X chromosome choosing. Cell 92: 657-665.

Mavilio, F. and 9 others. 1983. Molecular mechanisms for human hemoglobin switching: Selective undermethylation and expression of globin genes in embryonic, fetal, and adult erythroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6907-6911.

McArthur, M. and J. O. Thomas. 1996. A preference of histone H 1 for methylated DNA. EMBO J. 15: 1705-1715.

Mendez, R. and J. D. Richter.2001. Translational control by CPEB: A means to the end. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 521-529.

Mendez, R., K. G. Murthy, K. Ryan, J. L. Manley and J. D. Richter. 2000. Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. Mol. Cell 6: 1253-1259.

Mermoud, J. E., B. Popova, A. H. Peters, T. Jenuwein and N. Brockdorff. 2002. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. Curr. Biol. 12: 247-251.

Migeon, B.R. and K. Jelalian. 1977. Evidence for two active X chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. Nature 269: 242-243.

Migeon, B.R., M.M. Holland, D. J. Driscoll and J. C. Robinson. 1991. Programmed demethylation in CpG islands during human fetal development. Somatic Cell Mol. Genet. 17: 159-168.

Migeon, B.R., C.H. Lee, A.K. Chowdhury and H. Carpenter. 2002. Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. Am. J. Hum. Genet. 71: 286-293.

Mizzen, C. A. and 11 others. 1996. The $TAF_{II}250$ subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. Cell 87: 1261-1270.

Monk, M., M. Boubelik and S. Lehnert. 1987. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic, and germ cell lineages during mouse embryo development. Development 99: 371-382.

Muta, M., Y. Kamachi, A. Yoshimoto, Y. Higashi and H. Kondoh. 2002. Distinct roles of Sox2, Pax6, and Maf transcription factors in the regulation of lens-specific ol crystallin enhancer. Genes Cells 7: 791-805.

Myers, L. C. and R. D. Kornberg.2000. Mediator of transcriptional regulation. Annu. Rev. Biochem. 69: 729-749.

Nabel-Rosen, H., G. Volohonsky, A. Reuveny, R. Zaidel-bar and T. Volk. 2002. Two isoforms of the Drosophila RNA binding protein How act in opposite directions to regulate tendon cell differentiation. Dev. Cell 2: 183-193.

Nagoshi, R. N., M. McKeown, K. C. Burtis, J. M. Belote and B. S. Baker. 1988. The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in D. melanogaster. Cell 53: 229-236.

Nakayama, A., M.-T. Nguyen, C. C. Chen, K. Opdecamp, C. A. Hodgkinson and H. Arnheiter. 1998. Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deamess gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. Mech. Dev. 70: 155-166.

Nan, X., H.-H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature 393: 386-389.

Nicholls, R. D. 1998. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. Trends Genet. 14: 194-200.

Norris, D. P., D. Patel, G. F. Kay, G. D. Penny, N. Brockdorff, S. A. Sheardown and S. Rastan. 1994. Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. Cell 77: 41-51.

Offield, M., F. N. Hirsch and R M. Grainger. 2000. The use of Xenopus tropicalis transgenic lines for studying lens developmental timing in living embryos. Development 127: 1789-1797.

Ogryzko, V. V, R. L. Schlitz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell 87: 953-959.

O'Kane, C. J. and W. J. Gehring. 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9123-9127.

Orphanides, G. and D. Reinberg.2002. A unified theory of gene expression. Cell 108: 439-451.

Panning, B., J. Dausman and R. Jaenisch. 1997. X chromosome inactivation is mediated by Xist stabilization. Cell 90: 907-916.

Parvis, F., J. Li, K. H. Kaestner and S. A. Duncan. 2002. Generation of conditionally null allele of hnf4α. genesis 32: 130-133.

Pennisi, E. 2000. Matching the transcription machinery to the right DNA. Science 288: 1372-1373.

Penny, G.D., G.F. Kay, S. A. Sheardown, S. Rastan and N. Brockdorff. 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. Nature 379: 131-137.

Plaza, S., C. Dozier and S. Saule. 1993. Quail PAX6 (PAX-QNR) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. Cell Growth Diff: 4: 1041-1050.

Price, E. R. and 7 others. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes: c-Kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. J. Biol. Chem. 273: 33042-33047.

Rea, S. and 10 others. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature 406: 593-599.

Rebagliati, M. R., D. L. Weeks, R. P. Harvey and D. A. Melton. 1985. Identification and cloning of localized maternal RNAs from Xenopus eggs. Cell 42: 769-777.

Rideout, W. M. III, K Eggan and R. Jaenisch. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. Science 293: 1093-1098.

Roopra, A., S. Sharling, I. C. Wood, T. Briggs, U. Bachfischer, A. J. Paguette and N. J. Buckley. 2000. Transcriptional repression by neuronrestrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. Mol. Cell Biol. 20: 2147-2157.

Rosenthal, E., T. Hunt and I- V. Ruderman. 1980. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, Spisula solidissima. Cell 20: 487-495.

Rosenthal, L. and J. Meldolesi. 1989. α-Latrotoxin and related toxins. Pharm. Ther. 42: 115-134.

Roux, W. 1894. The problems, methods, and scope of developmental mechanics. In W. M. Wheeler (trans.), Biological Lectures of the Marine Biology Laboratory, Woods Hole. Ginn, Boston, pp. 149-190.

Sado, T., Z. Wang, H. Sasaki and E. Li. 2001. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. Development 128: 1275-1286.

Saito, Y. and 8 others. 2000. The developmental and aging changes of Down's syndrome celi adhesion molecule expression in normal and Down's syndrome brains. Acta Neuropathol. 100: 654-664.

Sallés, F. I., M. E. Lieberfarb, C. Wreden, J. P. Gergen and S. Strickland. 1994. Coordinate initiation of Drosophila development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. Science 266: 1996-1999.

Sander, M., A. Neubüser, H. Ee, G. R. Martin and M. S. German. 1997. Genetic analysis reveals that Pax6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. Genes Dev. 11: 1662-1673.

Sanford, J. P., H. J. Clark, V. M. Chapman and J. Rossant. 1987. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. Genes Dev. 1: 1039-1046.

Sauer, F., J. D. Fondell, Y. Ohkuma, R. G. Roeder and H. Jäckle. 1995. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIE. Nature 375: 162-165.

Schlissel, M. S. and D. D. Brown.1984. The transcriptional regulation of Xenopus 5S RNA genes in chromatin: The roles of active stable transcription complex and histone H1. Cell 37: 903-913.

Schmucker, D. and 7 others. 2000. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell 101: 671-684.

Schoenherr, C. J. and D. J. Anderson. 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): A coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. Science 267: 1360-1363.

Shatkin, A. J. 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. Cell 9: 645-653.

Shaw, G. and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell 46: 659-667.

Sheardown, S. A. and 9 others. 1997. Stabilization of Xist RNA mediates initiation of X chromosome inactivation. Cell 91: 99-107.

Sheiness, D. and J. E. Darnell. 1973. Polyadenylic segment in mRNA becomes shorter with age. Nature Nev Biol. 241: 265-268.

Smibert, C. A., J. E. Wilson, K. Kerr and P. M. Macdonald. 1996. Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. Genes Dev. 10: 2600-2609.

Smith, E. R., C. D. Allis and J. C. Lucchesi. 2001. Linking global histone acetylation to the transcription enhancement of X-chromosomal genes in Drosophila males. J. Biol. Chem. 276: 31483-31486.

Sopta, M., Z. F. Burton and J. Greenblatt. 1989. Structure and associated DNA helicase activity of a general transcription factor that binds to RNA polymerase II. Nature 341: 410-415.

Sosnowski, B. A., J. M. Belote and M. McKeown. 1989. Sex-specific alternative splicing of RNA from the transformer gene results from sequence-specific splice site blockage. Cell 58: 449-459.

Standart, N., T. Hunt and J. V. Ruderman. 1986. Differential accumulation of ribonudeotide reductase subunits in clam oocytes: The large subunit is stored as a polypeptide, the small subunit as untranslated mRNA. J. Cell. Biol. 103: 2129-2136.

Stebbins-Boaz, B., Q. Cao, C. H. de Moor, R. Mendez and J. D. Richter. 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF-4E. Mol. Cell 4: 1017-1027.

Steingrimsson, E. and 10 others.1994. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. Nature Genet. 8: 256-263.

Sträßer, K. and E. Hurt. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction withYra1p. Nature 413: 648-652.

Sugimoto, M., S.-S. Tan and N. Takagi. 2000. X chromosome inactivation revealed by the X-linked lacZ transgene activity in periimplantation mouse embryos. Int. J. Dev. Biol. 44: 177-182.

Tagaki, N. 1974. Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos. Exp. Cell Res. 86: 127-135.

Tagaki, N. and K. Abe. 1990. Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. Development 109: 189-201.

Tamaru, H. and E. U. Selker. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa. Nature 414: 277-283.

Thoma, F., T. Koller and A. Klug. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. J. Cell. Biol. 83: 403-427.

Tian, M. and T. Maniatis. 1992. Positive control of pre-mRNA splicing in vitro. Science 256: 237-240.

Tian, M. and T. Maniatis. 1993. A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. Cell 74: 105-115.

Trudel, M. and F. Constantini. 1987. A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human -globin gene. Genes Dev. 1: 954-961.

Ullrich, B., Y. A. Uskar,vov and T. C. Südhof 1995. Cartography of neurexins: More than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. Neuron 14: 497-507.

Valcárcel, J., R. Singh, P. D. Zamore and M. R Greene. 1993. The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. Nature 362: 171-175.

van der Ploeg, L. H. T. and R. D. Flavell. 1980. DNA methylation in the human γ-δ-β-globin locus in erythroid and nonerythroid cell. Cell 19: 947-958.

Wagenaar, E. B. and D. Mazia. 1978. The effect of emetine on the first deavage division of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. In E. R. Dirksen, D. M. Prescott and L. F. Fox (eds.), Cell Reproduction: In Honor of Daniel Mazua. Academic Press, New York, pp. 539-545.

Walker, M. D., T. Edlund, A. M. Boulet and W. J. Rutter. 1983. Cell-specific expression controlled by the 5' flanking region of the insulin and chymotrypsin genes. Nature 306: 557-561.

Weintraub, H. 1984. Histone H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. Cell 38: 17-27.

Weintraub, H. 1985. Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. Cell 42: 705-711.

Wickens, M. and K. Takayama. 1995. Deviants —or emissaries? Nature 367: 17-18.

Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun. 1993. Posttranslational regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cen 75: 855-862.

Williams, S. C., C. R. Altmann, R. L. Chow, A. Hemmati-Brivanlou and R. A. Lang. 1998. A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. Mech. Dev. 73: 225-229.

Wilson, T. and R. Treisman. 1988. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. Nature 336: 396-399.

Wold, B. J., W. H. Klein, B. R Hough-Evans, R. J. Britten and E. H. Davidson. 1978. Sea urchin embryo mRNA sequences expressed in nuclear RNA of adult tissues. Cell 14: 941-950.

Wolf, S. F., S. Dintgis, D. Toniolo, G. Persico, K. D. Lunnen, J. Axelman and B. R Migeon. 1984. Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of 3' CpG clusters: Implication for X chromosome dosage compensation. Nucleic Acids Res. 12:9333-9348.
Wolfe, S. L. 1993. Molecular and Cellular iology. Wadsworth, Belmont, CA.

Woychik, N. A. and M. Hampsey. 2002. The RNA polymerase II machinery: Structure illuminates function. Cell 108: 453-463.

Xu, W., M. A. S. Rould, S. Jun, C. Desplan and S. O. Pääbo. 1995. Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. Cell 80: 639-650.

Yamakawa, K., Y. K. Huot, M. A. Haendelt, R. Hubert, X.-N. Chen, G. E. Lyons and J. R. Korenberg. 1998. DSCAM: A novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. Hum. Mol. Genet. 7: 227-237.

Yasumoto, K.-I., K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita and S. Shibihara. 1997. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of human tyrosinase family genes. J. Biol. Chem. 272: 503-509.

Zeschingk, M., B. Schmitz, B. Dittrich, K. Buiting, B. Horsthemke and W. Doerfler. 1997. Imprinted segments in the human genome: Different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum. Mol. Genet. 6: 387-395.

Zhao, K., C. M. Hart and U. K. Laemmli. 1995. Visualization of chromosomal domains with boundary-element associated factor BEAF-32. Cell 81: 879-889.

Capítulo 6 Comunicación célula-célula en el desarrollo

Todo lo que usted toca
Usted lo cambia.
Todo lo que usted cambia
Lo cambia a usted.
La única verdad perdurable
Es el cambio.
OCTAVIA BUTLER (1998)

Al ocuparse de un sistema complejo como el embrión en desarrollo, es inútil investigar si cierto rudimento del órgano está "determinado" y si alguna característica de sus alrededores, con la exclusión de otras, lo "determina". Una veintena de diferentes factores pueden estar involucrados y sus efectos en su mayor parte intrincadamente entretejidos. Para resolver este enredo nosotros tenemos que investigar la manera en la que el sistema bajo consideración reacciona con otras partes del embrión en estadios sucesivos del desarrollo y bajo una gran variedad de condiciones experimentales tanto como esto sea posible.
R. G. HARRISON (1933)

LA FORMACIÓN DE CUERPOS ORGANIZADOS ha sido una de las grandes fuentes de preguntas para la especie humana. En efecto, el "milagro de la vida" parece apenas eso –la materia se ha llegado a organizar de un modo tal que vive.* Mientras que cada organismo comienza como una única célula, la progenie de esa célula forma estructuras complejas –tejidos y órganos– que son integradas en sistemas más grandes. Probablemente nadie reconozca mejor cuán destacable es en realidad la vida que los biólogos del desarrollo que consiguen estudiar cómo se origina esta complejidad. En la década de 1990, los biólogos del desarrollo han comenzado a responder algunas de las preguntas más importantes de la ciencia natural: se está comenzando a entender cómo se forman los órganos.

Inducción y competencia

Los órganos son estructuras complejas compuestas de numerosos tipos de tejidos. En el ojo de vertebrados, por ejemplo, la luz es transmitida a través del tejido corneal transparente y enfocada por el tejido del cristalino (el diámetro es controlado por el tejido muscular), chocando finalmente sobre el tejido de la retina neural. La organización precisa de estos tejidos en este órgano no puede ser interrumpida sin afectar su función. Tal coordinación en la construcción de órganos es llevada a cabo por un grupo de células que cambian el comportamiento de un sistema de células adyacentes, causando de ese modo que éstas cambien su forma, índice mitótico, o destino. Esta especie de interacción en un estrecho rango entre dos o más células o tejidos de historias y propiedades diferentes es denominada interacción próxima, o **inducción**.† Hay al menos dos componentes para cada interacción inductiva. El primer componente es el inductor: el tejido que produce la señal (o señales) que cambia los comportamientos celulares de los otros tejidos. El segundo componente, el tejido que está siendo inducido, es el respondedor.

* El rabino y médico Maimónides del siglo XII (1190) formuló la pregunta de la morfogénesis maravillosamente cuando observó que las personas devotas de aquellos días creían que un ángel de Dios había entrado al útero para formar los órganos del embrión. ¿Cuánto más poderoso sería el milagro de la vida, se preguntó, si la Deidad hubiera hecho la materia de modo tal que esta pudiera generar tal orden notable sin un ángel que moldea materia y sin necesidad de intervenir en cada embarazo? La idea de un ángel era todavía parte de la embriología del Renacimiento. El problema tratado hoy en día es la versión secular de la pregunta de Maimónides: ¿Cómo puede la materia sola construir los tejidos organizados del embrión?

† Estas inducciones son a menudo denominadas inducciones "secundarias", mientras que las interacciones de tejidos que generan al tubo neural se denominan "inducción embrionaria primaria". Sin embargo, no hay diferencias entre la naturaleza molecular de la inducción "primaria" y "secundaria". La inducción embrionaria primaria será detallada en los capítulos 10 y 11.

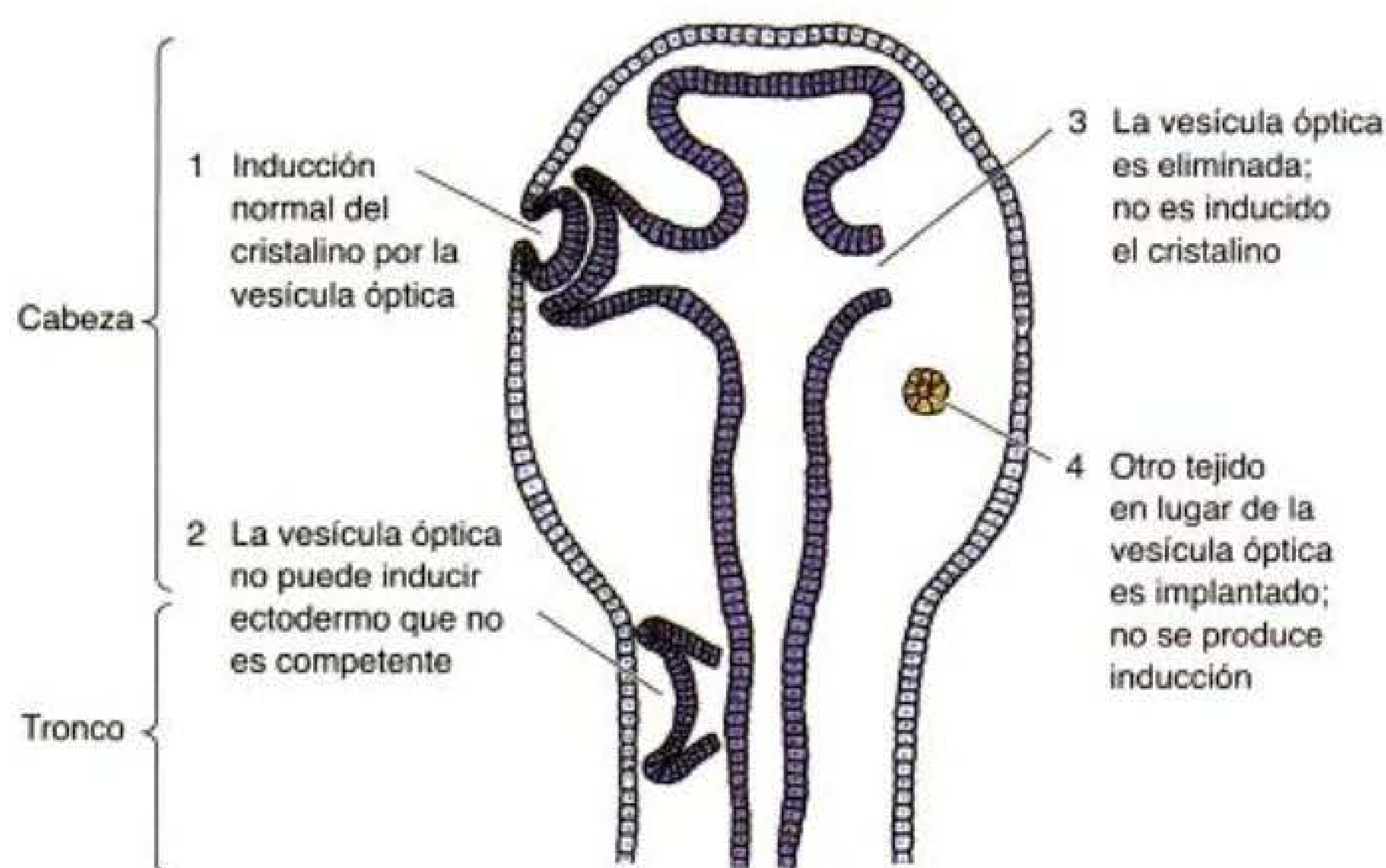


Fig. 6-1. Competencia ectodérmica y la capacidad para responder al inductor de la vesícula óptica en *Xenopus.* La vesícula óptica puede inducir la formación del cristalino en la porción anterior del ectodermo (1), pero no en el tronco y en el abdomen presuntivos (2). Si la vesícula óptica es eliminada (3), el ectodermo superficial forma un cristalino anormal o no forma cristalino. (4) La mayoría de los otros tejidos no son capaces de sustituir a la vesícula óptica.

No todos los tejidos pueden responder a la señal que está siendo producida por un inductor. Por ejemplo, si la vesícula óptica (retina presuntiva) del *Xenopus laevis* es colocada en una localización ectópica (es decir, en un lugar diferente en el que ésta se forma normalmente) debajo del ectodermo de la *cabeza*, inducirá a que el ectodermo forme tejido del cristalino. Únicamente la vesícula óptica parece ser capaz de hacer esto; por lo tanto, ésta es un inductor. Sin embargo, si la vesícula óptica es colocada cerca del ectodermo en el *flanco* o *abdomen* del mismo organismo, el ectodermo no será capaz de formar tejido del cristalino. Solamente el ectodermo de la cabeza es competente para responder a las señales de la vesícula óptica para producir un cristalino* (fig. 6-1; Saha y col. 1989; Grainger 1992).

Esta capacidad para responder a una señal inductiva específica es denominada **competencia** (Waddington 1940). La competencia no es un estado pasivo, sino una condición adquirida activamente. Por ejemplo, en el desarrollo del ojo de mamíferos, la proteína Pax6 parece ser importante en hacer que el ectodermo competente responda a la señal inductiva de la vesícula óptica. La expresión del gen *Pax6* es vista en el ectodermo de la cabeza, que puede responder a la vesícula óptica para formar un cristalino, y no se ve en otras regiones del ectodermo superficial (véase fig. 4-17; Li y col. 1994). La importancia de Pax6 como un **factor competente** fue demostrada por experimentos de recombinación utilizando tejido de ojo de embriones de rata (Fujiwara y col. 1994). La rata mutante *Pax6* homocigota tenía un fenotipo similar al del ratón mutante *Pax6* homocigota (véase cap. 4), careciendo de ojos y de nariz. Se ha demostrado que parte de este fenotipo es debido a una falla en la inducción del cristalino (fig. 6-2). Pero ¿cuál es el componente defectuoso, la vesícula óptica o el ectodermo superficial?

Cuando el ectodermo de la cabeza de embriones de rata mutante de *Pax6* fue combinado con una vesícula óptica tipo salvaje, no se formó ningún cristalino. Sin embargo, cuando el ectodermo de la cabeza de embriones de rata tipo salvaje fue combinado con una vesícula óptica mutante de *Pax6*, el cristalino era formado normalmente (fig. 6-3). Por lo tanto, *Pax6* es necesario para que el ectodermo superficial responda a la señal inductiva

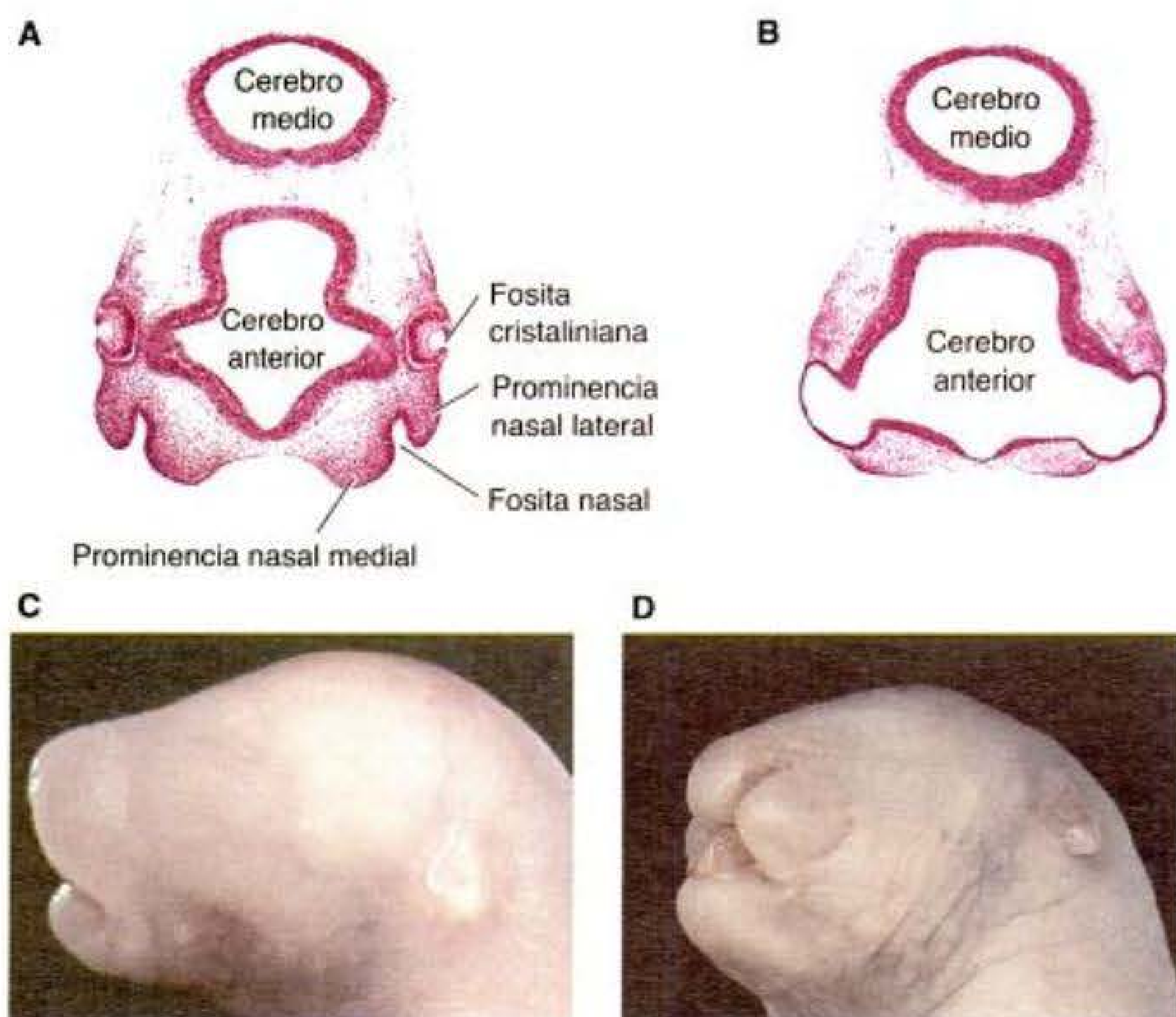
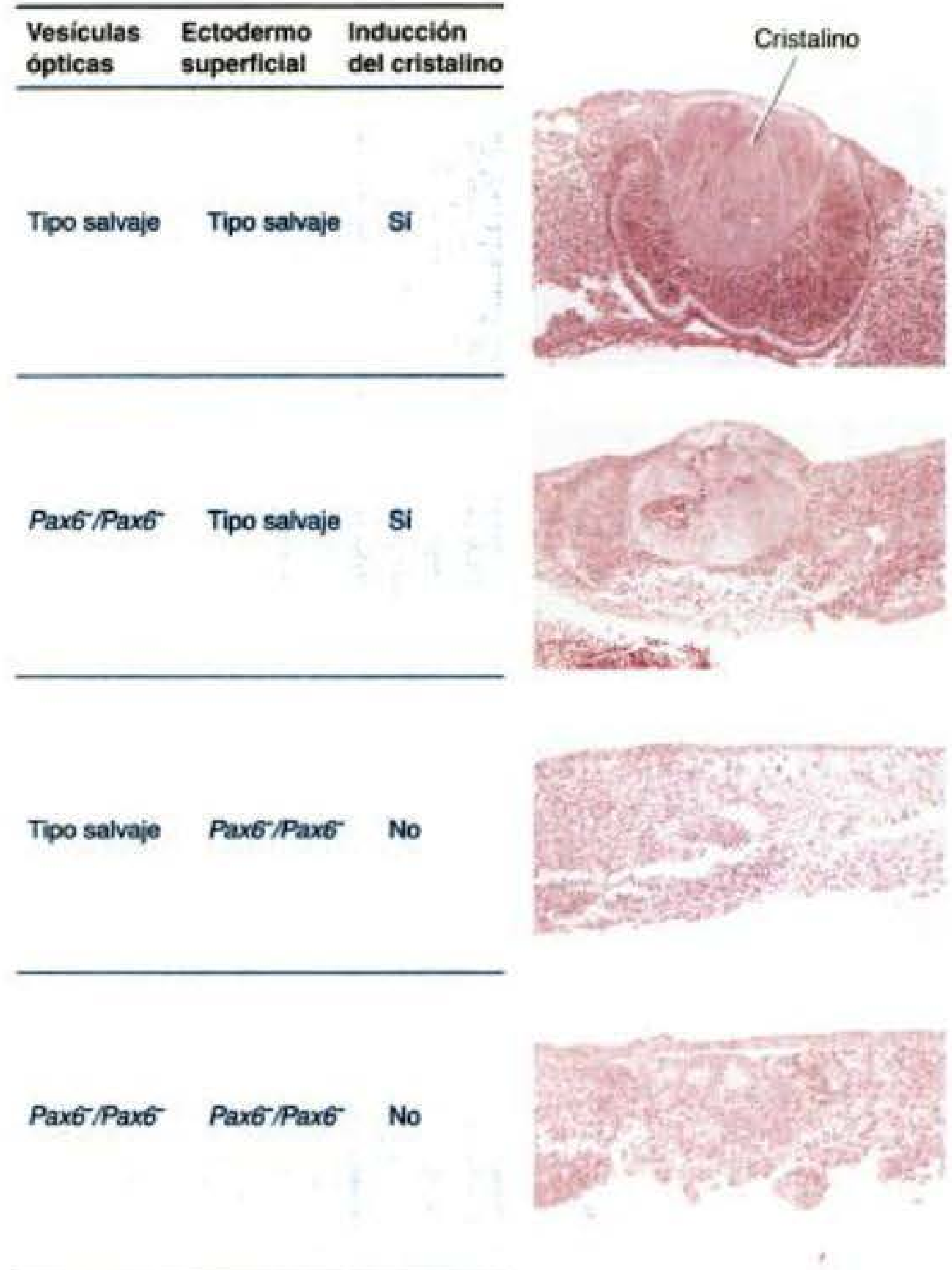


Fig. 6-2. Inducción de las estructuras óptica y nasal mediante Pax6 en embriones de rata. **A, B.** Histología de los embriones tipo salvaje **(A)** y del mutante *Pax6* homocigota **(B)** a los 12 días de gestación que muestra la inducción de los cristalinos y el desarrollo de la retina en el embrión tipo salvaje, pero no en el mutante. Del mismo modo, ni la fosita nasal ni la prominencia nasal medial es inducida en las ratas mutantes. **C.** Ratas tipo salvaje recién nacidas que muestran una nariz prominente así como ojos (cerrados). **D.** Ratas mutantes *Pax6* recién nacidas que no muestran ni ojos ni nariz. (De Fujiwara y col. 1994; fotografías cortesía de M. Fujiwara.)

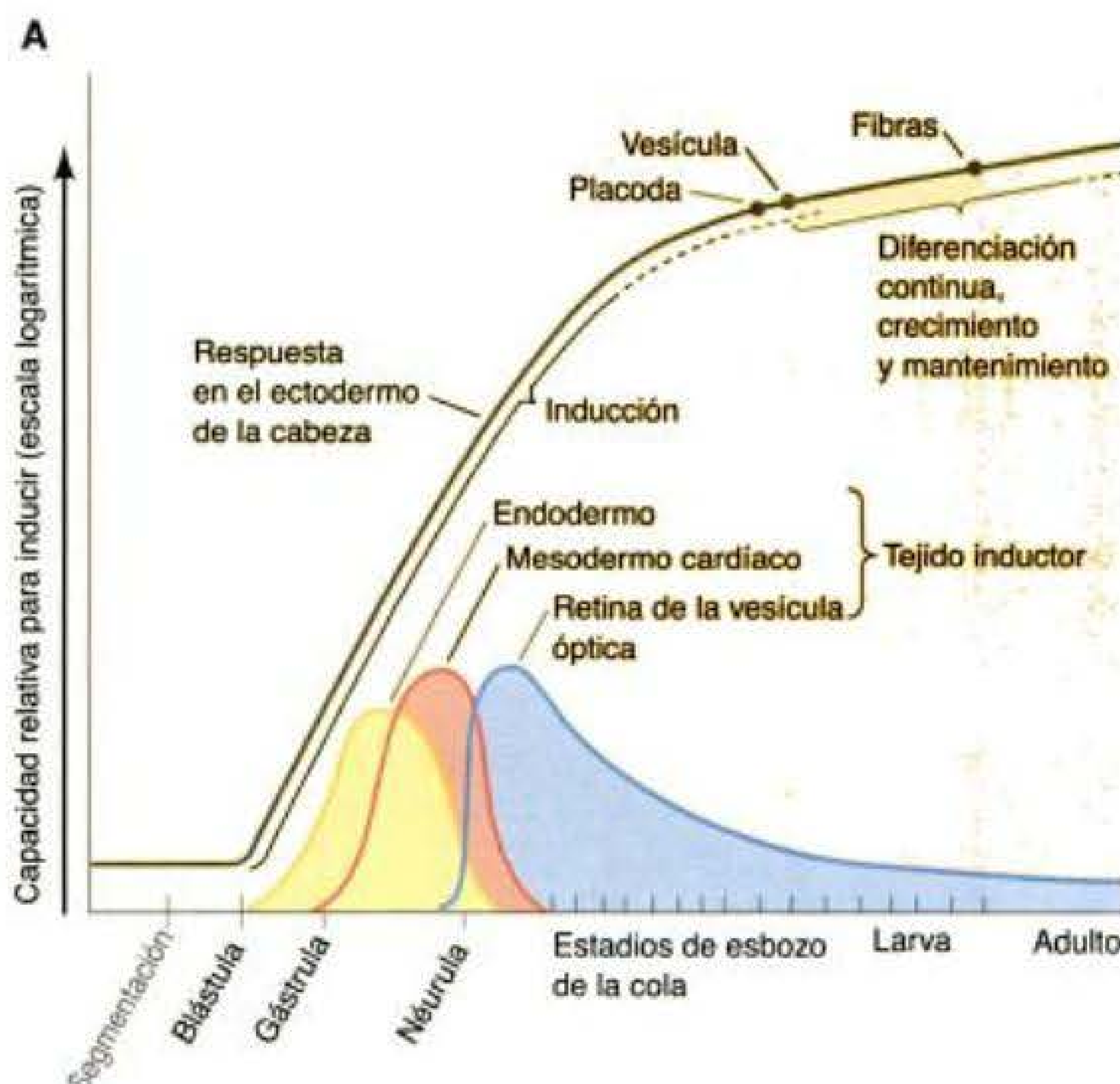
* Cuando se describe la inducción del cristalino, se debe ser cuidadoso en mencionar qué especie se está estudiando debido a que hay numerosas diferencias específicas de especie. En algunas especies, la inducción del cristalino no se producirá a ciertas temperaturas. En otras especies, la totalidad del ectodermo puede responder a la vesícula óptica para formar el cristalino. Estas diferencias específicas de especie han hecho esta área muy difícil de estudiar (Jacobson y Sater 1988; Saha y col. 1989; Saha 1991).

Fig. 6-3. Los experimentos de recombinación muestran que la deficiencia de inducción de ratas *Pax6* deficientes es provocada por una incapacidad del ectodermo superficial para responder a la vesícula óptica. (Fotografías cortesía de M. Fujiwara.)



de la vesícula óptica; el tejido que induce no lo necesita. Se desconoce cómo *Pax6* llega a ser expresado en el ectodermo anterior del embrión, aunque se piensa que su expresión es inducida por las regiones anteriores de la placa neural. La competencia para responder al inductor de la vesícula óptica (y a la expresión de *Pax6*) puede ser concedida al tejido ectodérmico mediante su incubación cerca del tejido de la placa neural anterior (Henry y Grainger 1990; Li y col. 1994; Zygar y col. 1998).

No hay un único inductor del cristalino. Los estudios en anfibios sugieren que el primer inductor puede ser el endodermo faríngeo y el mesodermo formador de corazón que son la base del ectodermo formador del cristalino durante los estadios de gástrula media y temprana (Jacobson 1963, 1966). La placa neural anterior puede producir las señales siguientes, incluida una señal que promueve la síntesis de Pax6 en el ectodermo anterior (Zygar y col. 1998; fig. 6-4). Por lo tanto, la vesícula óptica parece ser *el* inductor, pero el ectodermo anterior ha sido en realidad inducido por al menos otros dos factores. (La situación es como la de aquel jugador que patea "metiendo un gol" en un partido de fútbol.) La vesícula óptica parece secretar dos factores



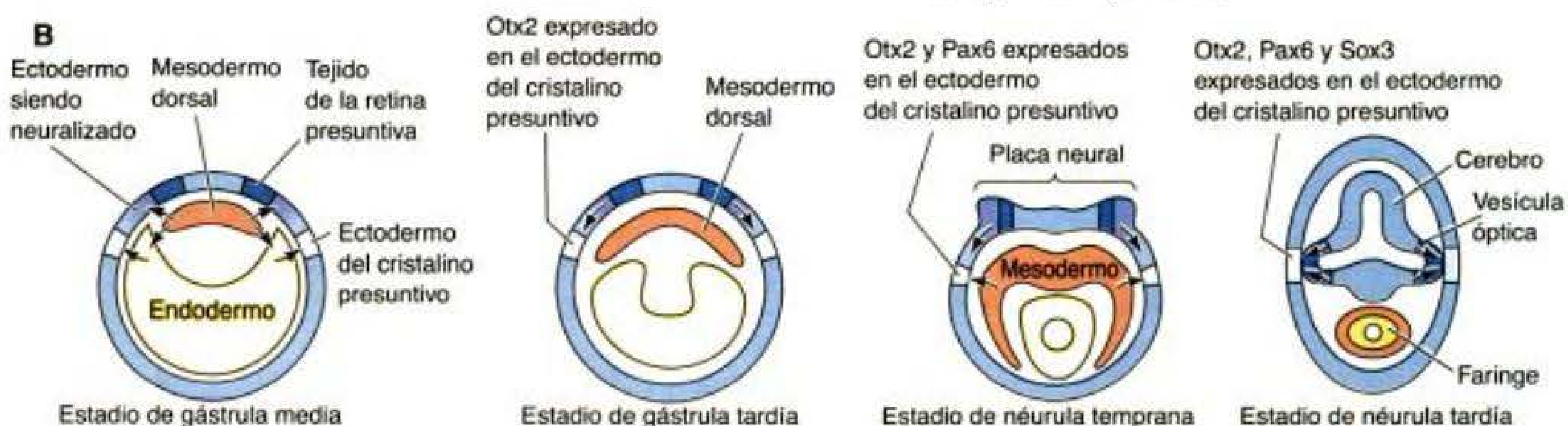


Fig. 6-4. Inducción del cristalino en anfibios. **A.** Los efectos aditivos de los inductores, como lo muestran los experimentos de trasplante y extirpación (eliminación) sobre el tritón *Taricha torosa*. La capacidad para producir tejido del cristalino es primero inducida por endodermo faríngeo, luego por mesodermo cardíaco, y finalmente por la vesícula óptica. La vesícula óptica adquiere por último la capacidad para inducir el cristalino y mantener su diferenciación. **B.** Secuencia de inducción postulada por experimentos similares realizados en embriones de rana *Xenopus laevis*. Inductores no identificados (posiblemente del endodermo faríngeo y del mesodermo formador de corazón) llevan a la síntesis del factor de transcripción Otx2 en el ectodermo de la cabeza durante el estadio de gástrula tardío. Cuando se elevan los pliegues neurales, los inductores de la placa neural anterior (incluyendo la región que formará la retina) inducen la expresión de *Pax6* en el ectodermo anterior que puede formar el tejido del cristalino.
La expresión de la proteína Pax6 puede constituir la competencia del ectodermo superficial para responder a la vesícula óptica durante el estadio de néurula tardía. La vesícula óptica secreta factores (probablemente de la familia BMP) que inducen la síntesis de los factores de transcripción Sox e inician la formación de un cristalino observable. (**A**, según Jacobson 1966; **B**, según Grainger 1992.)

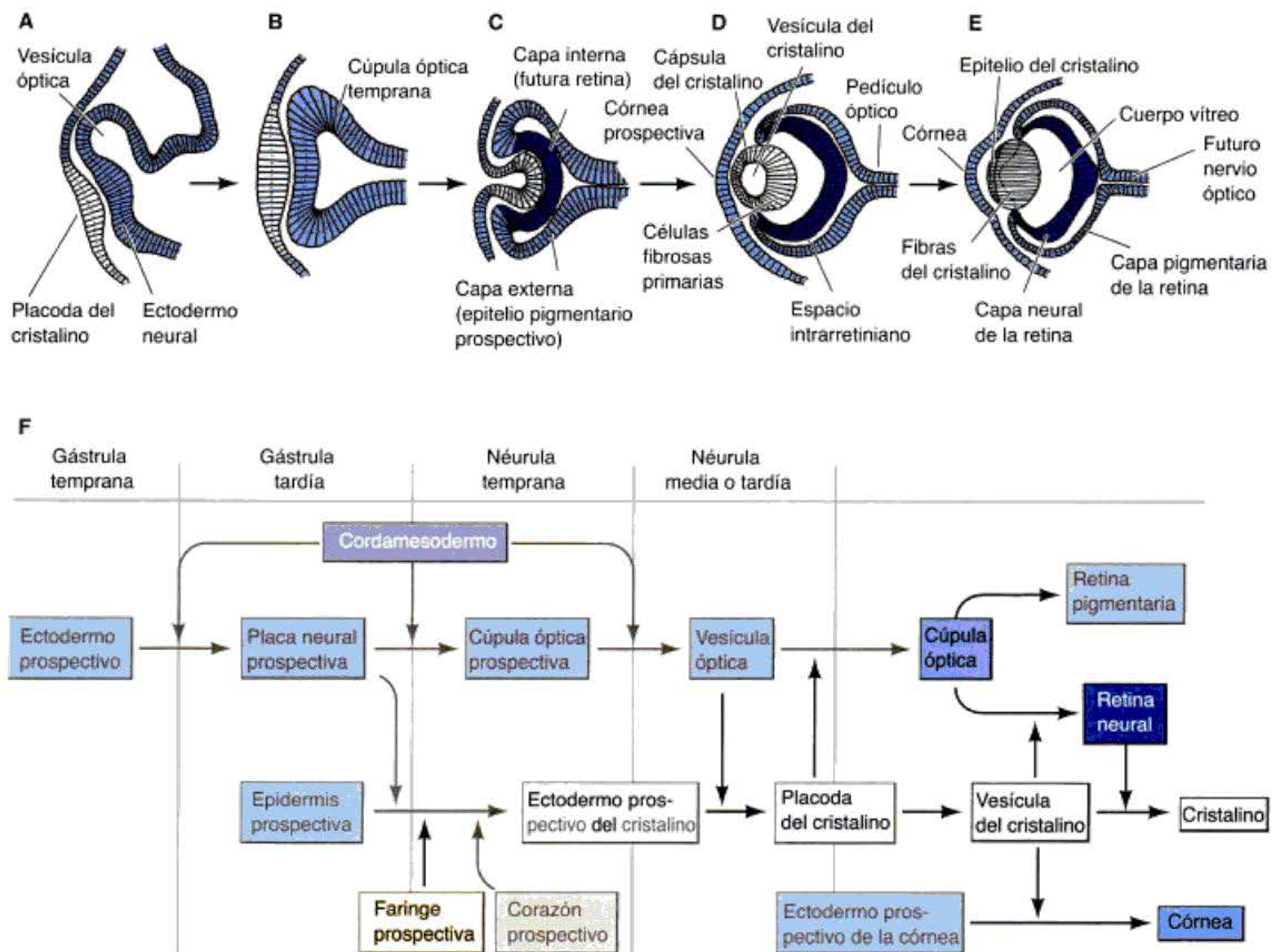


Fig. 6-5. Diagrama esquemático de la inducción del cristalino del ratón. **A.** En el día 9 embrionario, la vesícula óptica se extiende desde el cerebro anterior hacia el ectodermo superficial. La placoda del cristalino (el cristalino prospectivo) aparece como un engrosamiento local del ectodermo superficial cerca de la vesícula óptica. **B.** Hacia la mitad del día 9, la placoda del cristalino ha aumentado de tamaño y la vesícula óptica ha formado una cúpula óptica. **C.** Hacia la mitad del día 10, la porción central del ectodermo formador del cristalino se invagina, mientras que las dos capas de la retina llegan a ser distinguibles. **D.** Hacia la mitad del día 11, la vesícula del cristalino se ha formado. **E.** En el día 13, el cristalino consiste en células epiteliales cuboideas anteriores y células fibrosas posteriores alargadas. **F.** Resumen de algunas de las interacciones inductivas durante el desarrollo del ojo. (**A–E**, según Cvekl y Piatigorsky 1996.)

de inducción, uno de los cuales podría ser BMP4 (Furuta y Hogan 1998), una proteína que induce la producción de los factores de transcripción Sox2 y Sox3. La otra se piensa que es FGF8, una señal que induce la aparición del factor de transcripción L-Maf (Ogino y Yasuda 1998; Vogel-Höpker y col. 2000). La combinación de Pax6, Sox2, Sox3, y L-Maf asegura la producción del cristalino.

Cascadas de inducción: eventos inductivos consecutivos y recíprocos

Otra característica de la inducción es la naturaleza recíproca de muchas interacciones inductivas. Una vez que se ha formado el cristalino, éste luego puede inducir a otros tejidos. Uno de estos tejidos que responden es la misma vesícula óptica. Ahora el inductor se convierte en inducido. Bajo la influencia de factores secretados por el cristalino, la vesícula óptica llega a ser la cúpula óptica, y la pared de la cúpula óptica se diferencia en dos capas, la retina pigmentada y la retina neural (fig. 6-5; Cvekl y Piatigorsky 1996). Tales interacciones son denominadas inducciones recíprocas.

Al mismo tiempo, el cristalino también está induciendo al ectodermo que se encuentra por arriba para que se convierta en córnea. Como el ectodermo formador de cristalino, el ectodermo formador de córnea ha alcanzado una competencia particular para responder a las señales inductivas, en este caso las señales del cristalino (Meier 1977; Thut y col. 2001). Bajo la influencia del cristalino, las células del ectodermo de la córnea se convierten en columnares y secretan múltiples capas de colágeno. Las células mesenquimáticas de la cresta neural utilizan esta matriz de colágeno para ingresar en el área y secretar un grupo de proteínas (incluida la enzima hialuronidasa) que posteriormente diferenciarán la córnea. Una tercera señal, la hormona tiroxina, deshidrata el tejido y lo hace transparente (Hay 1980; Bard 1990). Por lo tanto, hay eventos inductivos consecutivos, y múltiples causas para cada inducción.

Interacciones instructivas y permisivas

Howard Holtzer (1968) distinguió dos modos principales de interacción inductiva. En la **interacción instructiva**, una señal de la célula inductora es necesaria para iniciar una nueva expresión del gen en la célula que responde. Sin la célula que induce, la célula que responde no es capaz de diferenciarse en un sentido particular. Por ejemplo, cuando la vesícula óptica es colocada experimentalmente bajo una nueva región del ectodermo de la cabeza y lleva a que esta región del ectodermo forme un cristalino, ésta es una interacción instructiva. Wessells (1977) ha propuesto tres principios generales característicos de la mayoría de las interacciones instructivas:

1. Ante la presencia del tejido A, el tejido B que responde se desarrolla de un cierto modo.
2. Ante la ausencia del tejido A, el tejido B que responde no se desarrolla de ese modo.
3. Ante la ausencia del tejido A, pero ante la presencia del tejido C, el tejido no se desarrolla de ese modo.

El segundo tipo de interacción inductiva es la **interacción permisiva**. Aquí, el tejido que responde contiene todos los potenciales que deben ser expresados, y solamente necesita un ambiente que permita la expresión de estas características.* Por ejemplo, muchos tejidos necesitan un sustrato sólido con fibronectina o laminina para poder desarrollarse. La fibronectina o la laminina no alteran el tipo de célula que es producido, solo permiten que se exprese lo que ha sido determinado.

Interacciones epitelio-mesenquimáticas

Algunos de los casos de inducción mejor estudiados son los que involucran las interacciones de láminas de células epiteliales con células mesenquimáticas adyacentes. Estas interacciones son denominadas **epitelio-mesenquimáticas**. Los epitelios son láminas o tubos de células conectadas; ellos pueden originarse desde cualquier capa germinal. Mesénquima se refiere a células sin conexión, dispuestas libremente. Las células mesenquimáticas son derivadas del mesodermo o de la cresta neural. Todos los órganos consisten de un epitelio y de un mesénquima asociado, de modo tal que las interacciones epitelio-mesenquimáticas están entre los fenómenos más importantes en la naturaleza. Algunos ejemplos son enumerados en el cuadro 6-1.

ESPECIFICIDAD REGIONAL DE LA INDUCCIÓN. Utilizando la inducción de estructuras cutáneas como ejemplos, se analizarán las propiedades de las interacciones epitelio-mesenquimáticas. La primera de estas propiedades es la especificidad regional de la inducción. La piel está compuesta por dos tejidos principales: una epidermis externa (un tejido epitelial derivado del ectodermo) y una dermis (un tejido mesenquimático derivado del mesodermo). La epidermis del pollo le indica a las células dérmicas subyacentes a formar condensaciones (probablemente mediante la secreción de las proteínas Sonic hedgehog y TGF-β2, que serán discutidas más adelante), y el mesénquima dérmico condensado responde mediante la secreción de factores que llevan a la epidermis a formar regionalmente estructuras cutáneas específicas (fig. 6-6; Nohno y col. 1995; Ting-Berreth y Chuong 1996). Estas estructuras pueden ser las amplias plumas del ala, las estrechas plumas del muslo, o las escamas y garras de los pies. Como lo muestra la figura 6-7, el mesénquima dérmico es responsable de la especificidad regional de la inducción en el epitelio epidérmico competente. Los investigadores pueden separar al epitelio y al mesénquima embrionario y recombinarlos de diferentes modos (Saunders y col. 1957). El mismo epitelio desarrolla estructuras cutáneas de acuerdo a la región a partir de la cual fue tomado el mesénquima. Aquí, el mesénquima cumple una función instructiva, llamando a jugar a diferentes grupos de genes en las células epiteliales que responden.

Cuadro 6-1 *Algunas interacciones epitelio-mesenquimáticas*

Órgano	*Componente epitelial*	*Componente mesenquimático*
Estructuras cutáneas (pelo, plumas, glándulas sudoríparas, glándulas mamarias)	Epidermis (ectodermo)	Dermis (mesodermo)
Miembros	Epidermis (ectodermo)	Mesénquima (mesodermo)
Órganos del intestino (hígado, páncreas, glándulas salivales)	Epitelio (endodermo)	Mesénquima (mesodermo)
Órganos faríngeos y respiratorios asociados (pulmones, timo, tiroides)	Epitelio (endodermo)	Mesénquima (mesodermo)
Riñón	Epitelio del esbozo ureteral (mesodermo)	Mesénquima (mesodermo)
Diente	Epitelio de la mandíbula (ectodermo)	Mesénquima (cresta neural)

* Es fácil distinguir las interacciones permisivas e instructivas mediante una analogía con una situación más familiar. Este libro se hace posible por interacciones permisivas e instructivas. Los revisores pueden convencerme para cambiar el material en los capítulos. Ésta es una interacción instructiva, pues la información expresada en el libro es cambiada de aquélla que debería haber sido. Sin embargo, la información en el libro no podría ser expresada en su totalidad sin las interacciones permisivas con el editor y la imprenta.

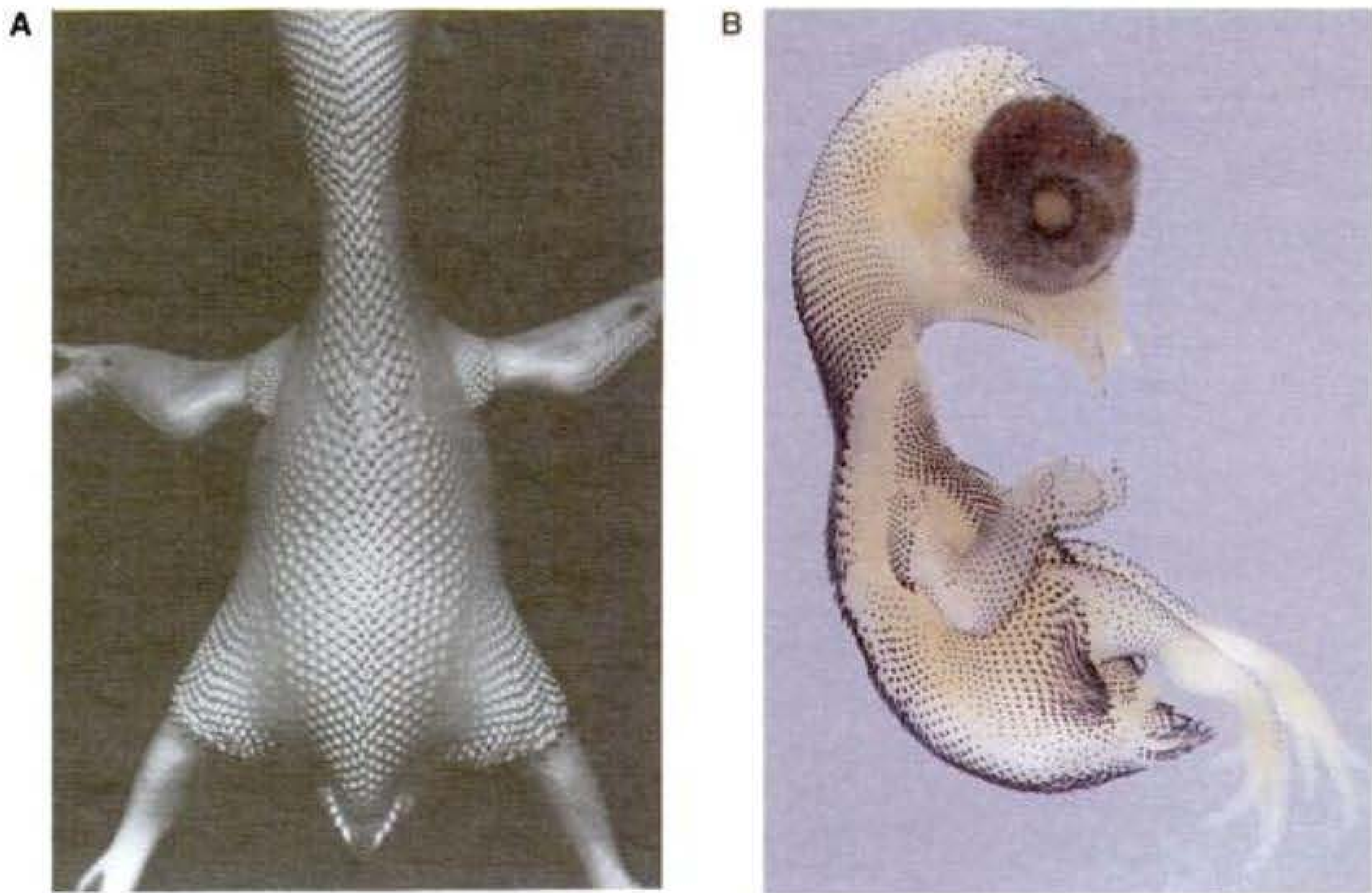


Fig. 6-6. A. Tractos de las plumas sobre el dorso de un embrión de pollo de 9 días. Obsérvese que cada primordio de pluma está localizado entre los primordios de dos hileras adyacentes. B. Hibridación in situ de un embrión de pollo de 10 días que muestra la expresión de *Sonic hedgehog* (manchas oscuras) en el ectodermo de las plumas y escamas en desarrollo. (A, cortesía de P. Sengal; B, cortesía de W.-S. Kim y J. F. Fallon.)

ESPECIFICIDAD GENÉTICA DE LA INDUCCIÓN. La segunda propiedad de las interacciones epitelio-mesenquimáticas es la especificidad genética de la inducción. Mientras que el mesénquima puede instruir al epitelio de modo tal que activa a grupos de genes, el epitelio que responde puede cumplir con estas instrucciones solamente en cuanto su genoma lo permite. Esta propiedad fue descubierta a través de experimentos que involucraban el trasplante de tejidos de una especie a otra. En uno de los ejemplos más espectaculares de inducción interespecífica, Hans Spemann y Oscar Schotté (1932) trasplantaron ectodermo del costado de una gástrula de *rana* temprana a la región de una gástrula de *tritón* destinada a convertirse en partes de la boca. Del mismo modo, colocaron ectodermo presuntivo del costado de una gástrula de *tritón* en las regiones orales presuntivas de los embriones de *rana*. Las estructuras de la región de la boca difieren ampliamente entre las larvas de la salamandra y de la rana. Las larvas de salamandra tienen balanceadores con forma de garrote cerca de la boca, mientras que el renacuajo de rana produce glándulas secretoras de moco y ventosas (fig. 6-8). El renacuajo de rana también tiene una mandíbula callosa sin

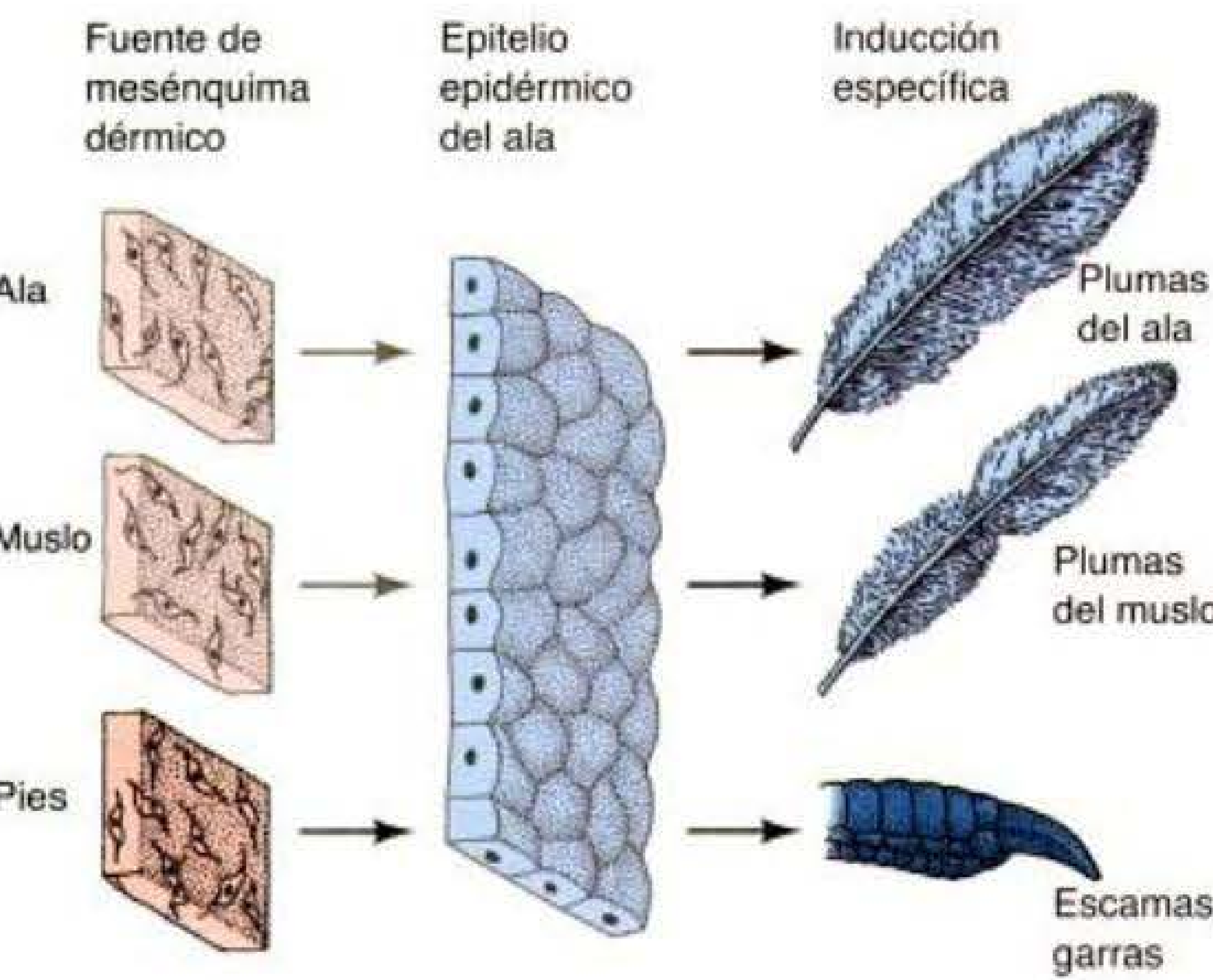


Fig. 6-7. Especificidad regional de inducción en el pollo. Cuando las células de diferentes regiones de la dermis (mesénquima) son recombinadas con la epidermis (epitelio), el tipo de estructura cutánea producida por el epitelio epidérmico es determinado por la fuente original de mesénquima. (Según Saunders 1980.)

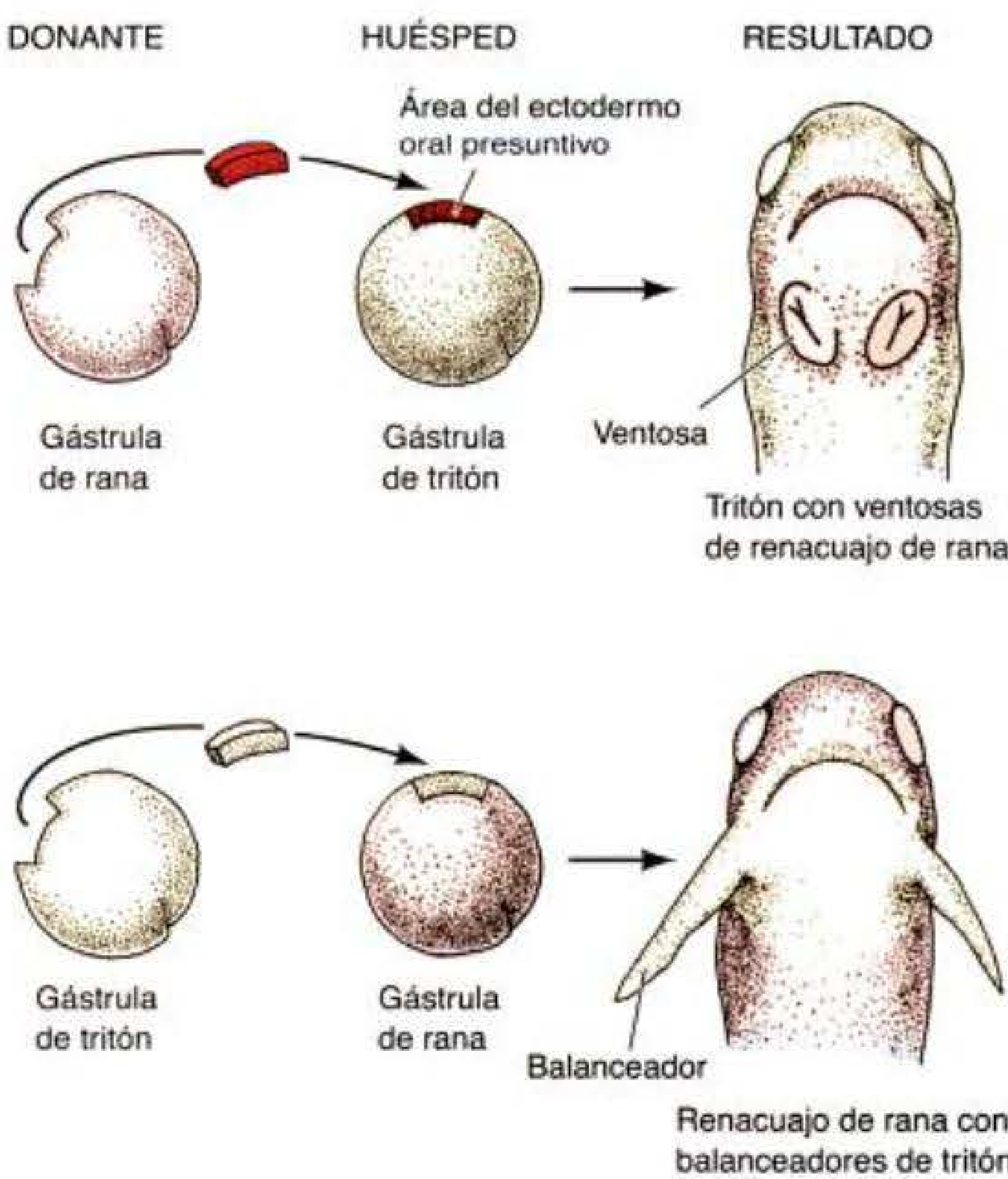


Fig. 6-8. Especificidad genética de inducción en anfibios. El trasplante recíproco entre las regiones del ectodermo oral presuntivo de las gástrulas de la salamandra y de la rana conduce a tritones con ventosas de renacuajo y renacuajos con balanceadores de tritón. (Según Hamburgh 1970.)

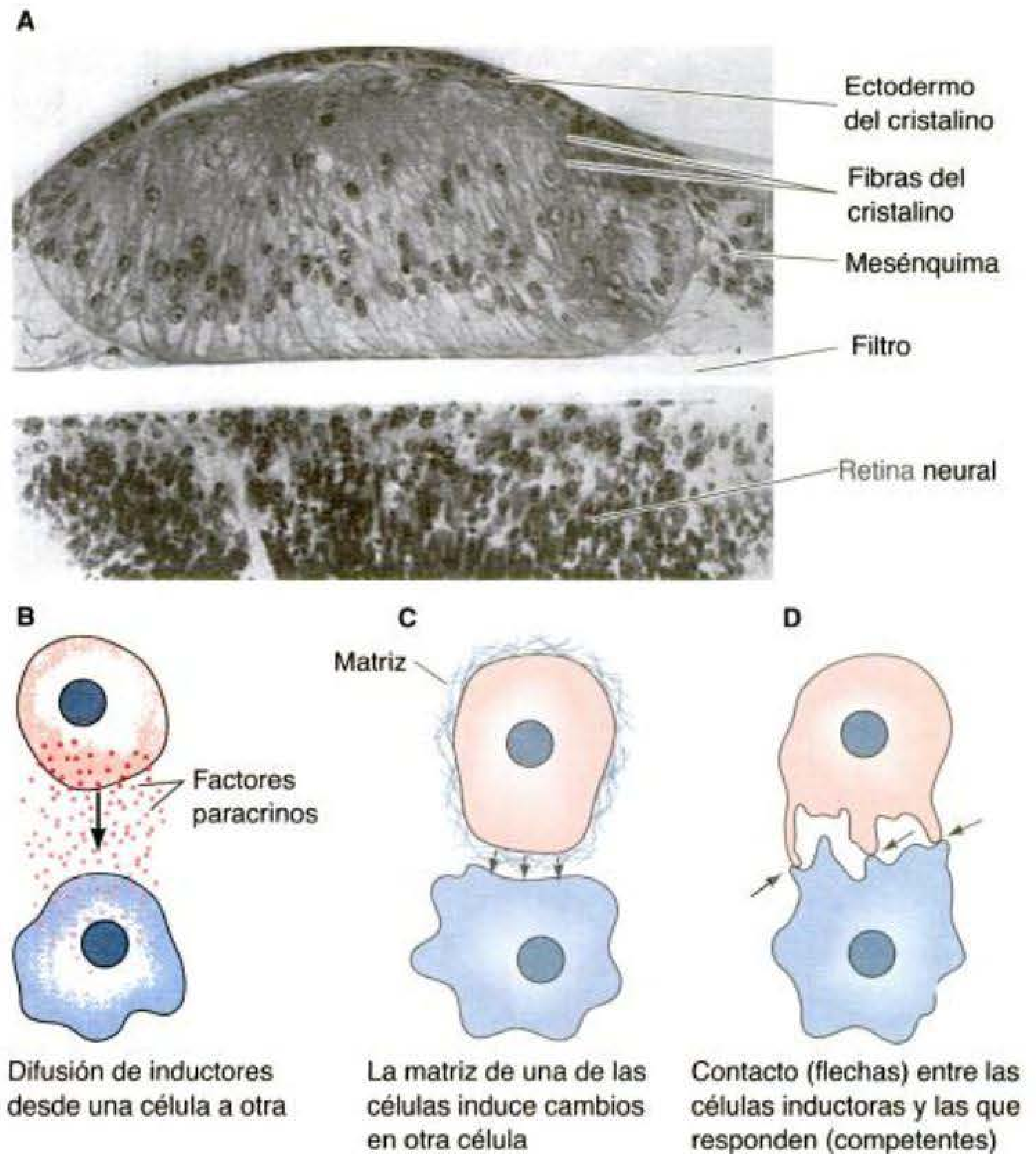


Fig. 6-9. Mecanismos de interacción inductiva. **A.** Una interacción paracrina. El ectodermo del cristalino presuntivo de ratón y el mesénquima fueron colocados sobre un filtro. El tejido de la retina fue colocado cerca de éste. Después de 3 días, se había desarrollado un cristalino a partir del ectodermo superficial. Ante la ausencia de una señal desde el tejido de la retina, el ectodermo superficial se habría hecho epidérmico. **B-D.** Modos de señalización paracrino y yuxtacrino. **B.** El modo paracrino de señalización involucra la secreción de moléculas difusibles desde una célula y su recepción por una célula vecina. **C.** En algunos casos, la señal paracrina puede venir de una proteína de la matriz extracelular secretada por una célula. **D.** En las interacciones yuxtacrinas, el contacto es establecido entre una molécula señalizadora sobre la superficie de una célula y su receptor sobre otra célula. (**A**, de Muthukkarapan 1965, fotografía cortesía de R. Auerbach; **B-D**, según Grobstein 1956.)

dientes, mientras que la salamandra tiene un conjunto de dientes calcáreos en la mandíbula. La larva resultante a partir de los trasplantes eran quimeras. La larva de salamandra tenía una boca parecida a la de la rana, y los renacuajos de rana tenían dientes y balanceadores de salamandra. En otras palabras, las células mesodérmicas instruyeron al ectodermo a producir la boca, pero el ectodermo respondió haciendo la única clase de boca que "sabía" hacer, no importa cuán inadecuada es.*

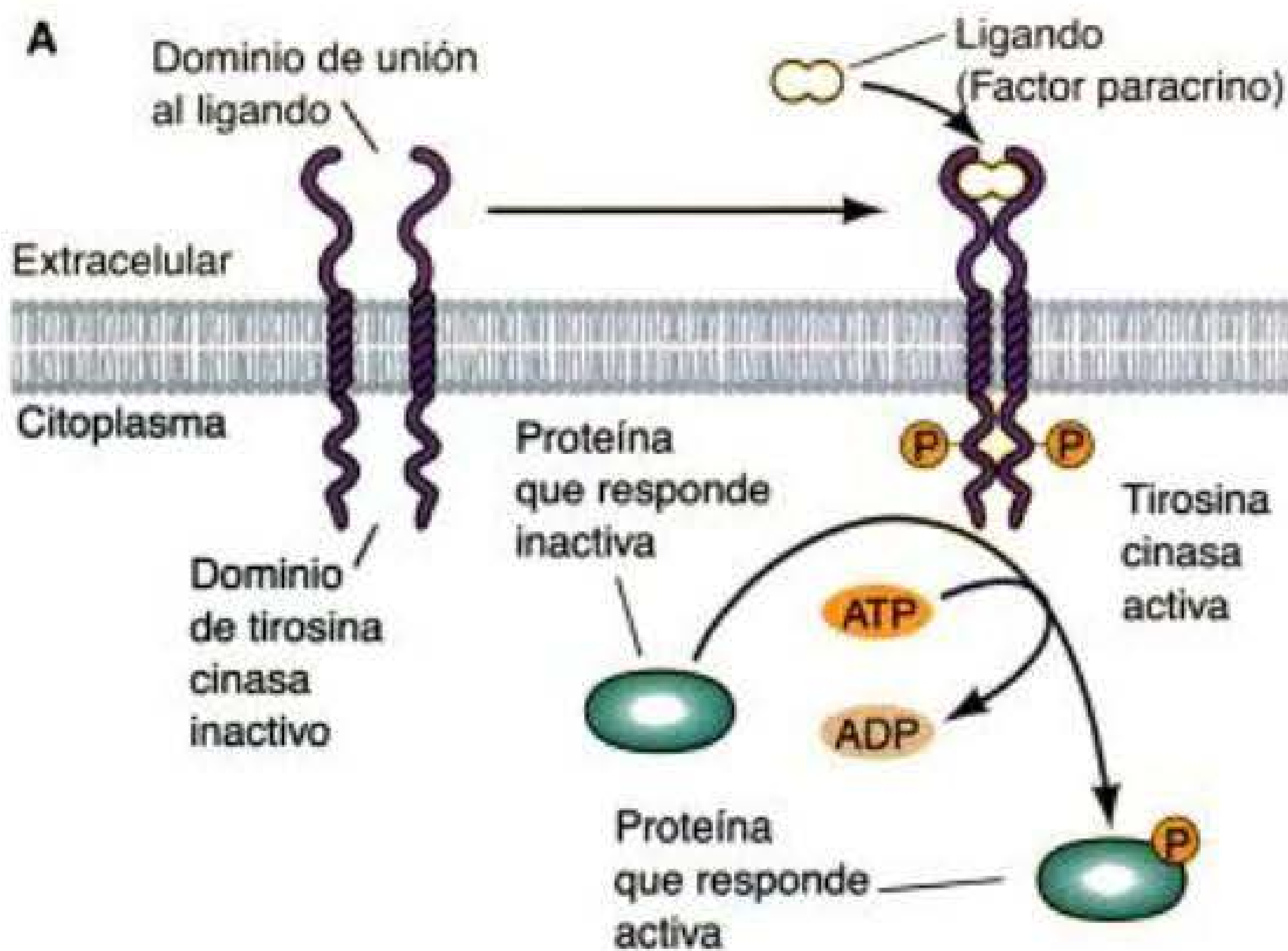
Por lo tanto, las instrucciones enviadas por el tejido mesenquimático pueden cruzar barreras de especie. Los tejidos de las salamandras responden a señales de la rana, y los del pollo responden a inductores de mamíferos. Sin embargo, la respuesta del epitelio, es específica de la especie. Así pues, mientras que la especificidad del tipo de órgano (p. ej., plumas o garras) en general es controlada por el mesénquima dentro de una especie, la especificidad de especie normalmente es controlada por el epitelio que responde. Tal como se verá en los capítulos 22 y 23, los grandes cambios evolutivos pueden ser causados cambiando la respuesta a un inductor particular.

* Spemann, como se relata, lo ha puesto de esta manera: "El ectodermo le dice al inductor, 'tú me dices haz una boca; está bien, lo haré, pero no puedo hacer tu clase de boca; puedo hacer la mía propia y eso haré.'" (citado en Harrison 1933).

SITIO WEB 6-1 **Dientes de gallina (Hen's teeth).** Algunos eventos inductivos entre especies pueden traer a la luz estructuras perdidas. El mesénquima molar del ratón puede ser capaz de inducir dientes en la mandíbula del ave.

Factores paracrinos

¿Cómo son transmitidas las señales entre el inductor y el respondedor (competente)? Mientras estudiaban los mecanismos de inducción que producen túbulos renales y dientes, Grobstein (1956) y otros (Saxén y col. 1976; Slavkin y Bringas 1976) hallaron que algunos acontecimientos inductivos podían producirse a pesar de un filtro que separaba a las células epiteliales y mesenquimáticas. Sin embargo, otras inducciones fueron bloqueadas por el filtro. Por lo tanto, los investigadores concluyeron que algunas de las moléculas inductivas eran factores solubles que podían pasar a través de los pequeños poros del filtro, y que otros eventos inductivos requerían de contacto físico entre las células epiteliales y mesenquimáticas (fig. 6-9). Cuando las proteínas de membrana celular sobre una superficie celular interactúan con proteínas receptoras sobre superficies celulares adyacentes, estos acontecimientos son denominados **interacciones yuxtacrinas** (debido a que las



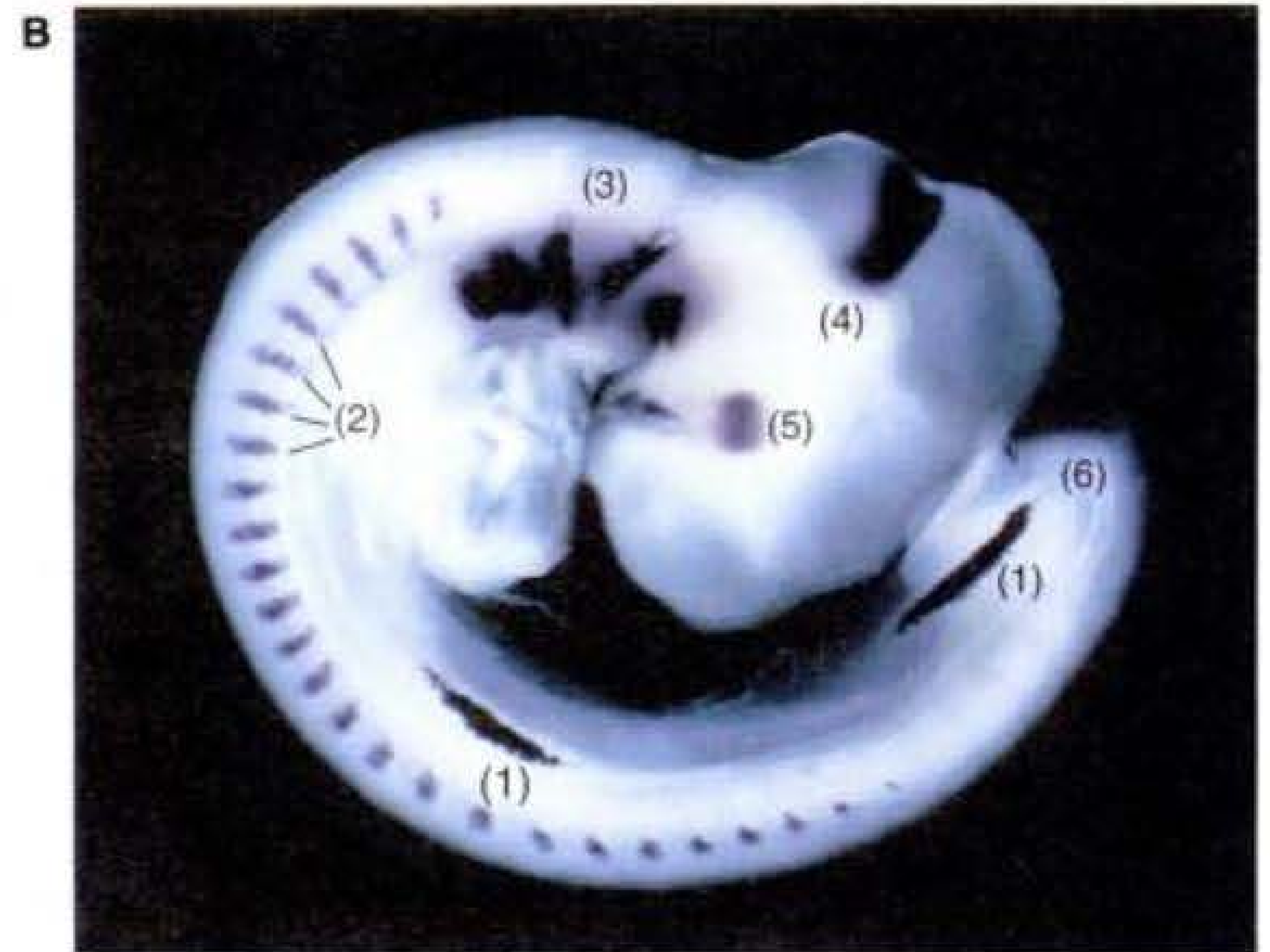


Fig. 6-10. Expresión de FGF y señalización. **A.** Estructura de un receptor tirosina cinasa. La unión de FGF a través de la porción extracelular del receptor proteico activa a la tirosina cinasa inactiva, cuya actividad enzimática fosforila a residuos tirosina específicos de ciertas proteínas. **B.** El patrón de expresión de *fgf8* en un embrión de pollo de 3 días es mostrado mediante hibridación in situ. FGF8 (áreas oscuras) es visto en el ectodermo más distal del esbozo del miembro (1) en el mesodermo somítico (2; los bloques segmentados de células a lo largo del eje anteroposterior), en los arcos branquiales del cuello (3), en el límite entre el cerebro medio y el cerebro posterior (4), en el ojo en desarrollo (5) y en la cola (6). (Fotografía cortesía de E. Laufer, C.-Y. Yeo y C. Tabin.)

membranas celulares están yuxtapuestas). Cuando las proteínas sintetizadas por una célula pueden difundir pequeñas distancias para inducir cambios en las células vecinas, el evento es denominado **interacción paracrina**, y las proteínas difusibles son denominadas **factores paracrinos** o **factores de crecimiento y diferenciación** (GDF). Se considerarán en primer lugar las interacciones paracrinas y luego en el capítulo se retornará a las interacciones yuxtacrinas.

Mientras que los **factores endocrinos** (hormonas) viajan a través de la sangre para ejercer sus efectos, los factores paracrinos son secretados en los espacios inmediatos alrededor de las células que los producen.* Estas proteínas son los "factores de inducción" de los embriólogos experimentales clásicos. Durante la última década, los biólogos del desarrollo han descubierto que la inducción de numerosos órganos es en realidad efectuada por un conjunto relativamente pequeño de factores paracrinos. El embrión hereda un "equipo de herramientas" bastante compacto y utiliza muchas de estas mismas proteínas para construir el corazón, los riñones, los dientes, los ojos y otros órganos. Además, las mismas proteínas son utilizadas a lo largo del reino animal; los factores activos en crear el ojo de *Drosophila* o el corazón son muy similares a aquellos utilizados en la generación de órganos de mamíferos. Muchos de estos factores paracrinos pueden ser agrupados en cuatro familias principales sobre la base de sus estructuras. Estas familias son la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), la familia Hedgehog, la familia Wingless (Wnt), y la superfamilia TGF-β.

Factores de crecimiento fibroblástico

La familia del **factor de crecimiento fibroblástico (FGF)** actualmente tiene casi dos docenas de miembros relacionados estructuralmente. FGF1 es también conocido como FGF ácido; FGF2 es denominado a veces FGF básico; y FGF7 a veces toma el nombre de factor de crecimiento de queratinocito. En vertebrados se conocen cerca de dos docenas de genes de FGF distintos, y pueden generar cientos de isoformas de proteínas mediante la variación en los diferentes tejidos del empalme de su RNA o de sus codones de iniciación (Lappi 1995). Los FGF pueden activar un conjunto de receptores de tirosina cinasa denominados **receptores de factores de crecimiento fibroblástico** (FGFR). Como se detallará más adelante en este capítulo, los receptores de tirosina cinasa son proteínas que se extienden a través de la membrana celular (fig. 6-10A). Sobre el lado extracelular de este receptor proteico está el sitio de unión al ligando, que une el factor paracrino. Sobre el lado intracelular se encuentra una tirosina cinasa inactiva (es decir, un dominio peptídico que puede fosforilar a otra proteína a partir de ATP). Cuando el receptor de FGF une un FGF (y solamente cuando éste une un FGF), la cinasa inactiva es

* Hay un debate considerable en cuanto a las distancias en las que los factores paracrinos pueden operar. La activina, por ejemplo, puede difundir muchos diámetros celulares y puede inducir diferentes grupos de genes a diferentes concentraciones (Gurdon y col. 1994, 1995; véase cap. 3) Sin embargo, las proteínas Vg1, BMP4 y Nodal, funcionan probablemente sólo sobre sus vecinos adyacentes (Jones y col. 1996; Reilly y Melton 1996). Estos factores pueden inducir la expresión de otros factores de corto alcance a partir de sus células vecinas, y puede ser iniciada una cascada de inducciones paracrinas.

Además de la regulación endocrina, paracrina y yuxtacrina, hay también una regulatción autocrina. Esta última se produce cuando las mismas células que secretan factores paracrinos también responden a ellos. En este caso, la célula sintetiza una molécula para la cual ésta tiene su propio receptor. Aunque la regulación autocrina no es común, se observa en las células del citotrofoblasto de la placenta; estas células sintetizan y secretan el factor de crecimiento derivado de plaqueta, cuyo receptor está sobre la membrana celular del citotrofoblasto (Goustin y col. 1985). El resultado es la proliferación explosiva de este tejido.

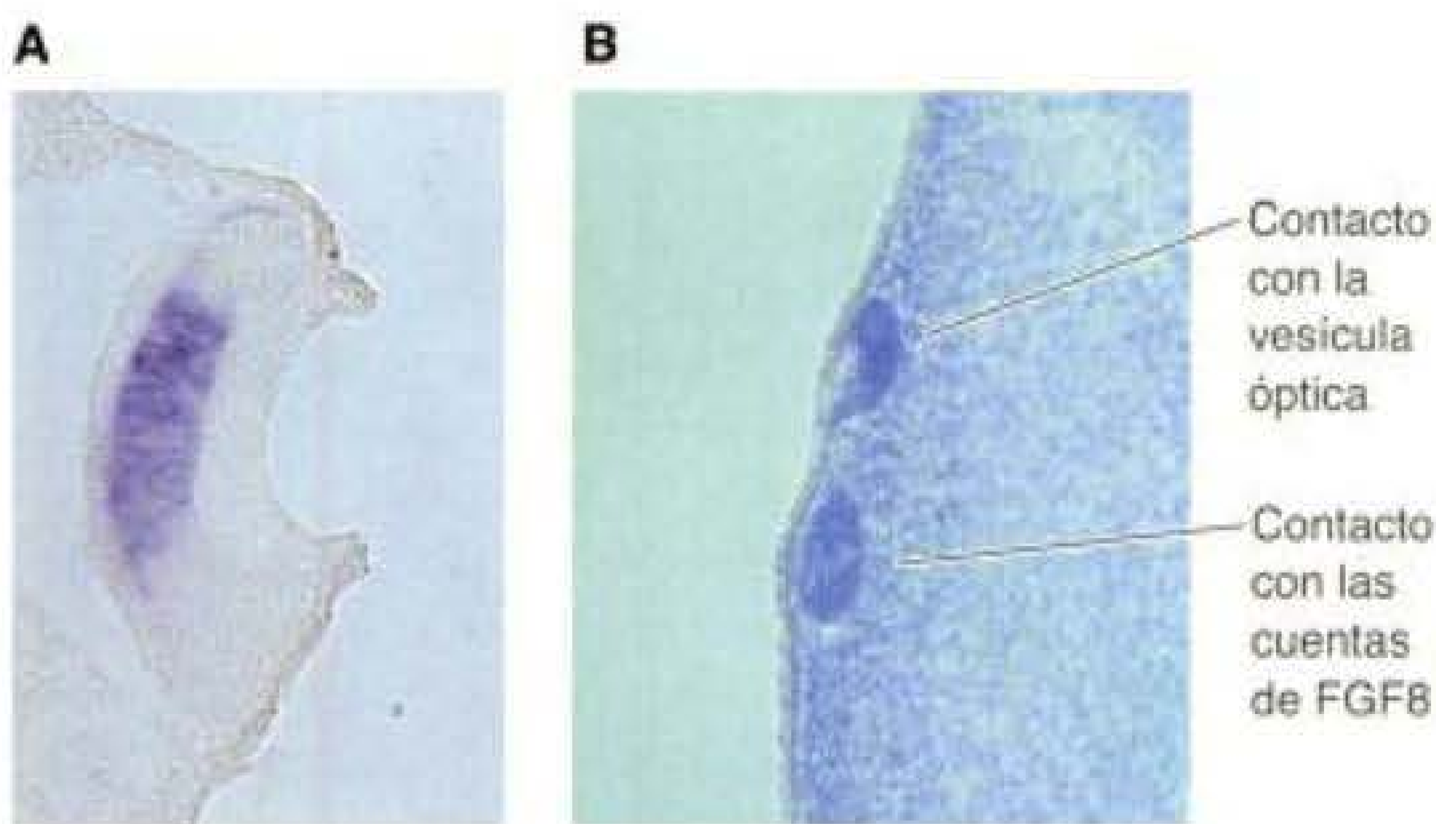


Fig. 6-11. Función de FGF8 en el ojo del pollo en desarrollo. **A.** Hibridación in situ de *fgf8* en la vesícula óptica. El mRNA de *fgf8* (violeta) está localizado en la retina neural presuntiva de la cúpula óptica y está en contacto directo con las células externas del ectodermo que llegarán a ser el cristalino. **B.** La expresión ectópica de L-Maf en el ectodermo competente puede ser inducida por la vesícula óptica (arriba) y por cuentas con FGF8 (abajo). (Fotografías cortesía de A. Vogel-Höpker.)

activada y fosforila ciertas proteínas dentro de la célula que responde. Estas proteínas, una vez activadas, pueden llevar a cabo nuevas funciones. Los FGF están asociados con varias funciones de desarrollo, incluida la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), formación del mesodermo y extensión del axón. Mientras que los FGF a menudo pueden sustituirse por otro, sus patrones de expresión les dan funciones separadas. FGF2 es especialmente importante en la angiogénesis, y FGF8 es importante para el desarrollo del cerebro medio, ojos y miembros (fig. 6-10B; Crossley y col. 1996).

FGF8 ha sido involucrado en la inducción del cristalino utilizado como un ejemplo anterior. FGF8 es usualmente expresado en la vesícula óptica que contacta al ectodermo externo de la cabeza (fig. 6-11; Vogel-Höpker y col. 2000). Después de producirse el contacto con el ectodermo externo, la expresión de *fgf8* se llega a concentrar en la región de la retina neural presuntiva –el tejido que apoya directamente sobre el cristalino presuntivo–. Además, si se colocan bolitas conteniendo FGF8 cercanas al ectodermo de la cabeza, FGF8 inducirá este ectodermo a producir cristalinos ectópicos y a expresar el factor de transcripción L-Maf asociado al cristalino.

SITIO WEB 6-2 **Unión de FGF (FGF binding).** La unión de FGF a sus receptores es un complejo acto acrobático que involucra a un interesante elenco de moléculas de superficie celular. Las glucoproteínas juegan un papel de soporte importante en este acontecimiento.

La familia Hedgehog

Las proteínas Hedgehog (erizo) constituyen una familia de factores paracrinos que a menudo son utilizados por el embrión para inducir tipos celulares específicos y para crear límites entre los tejidos. Los vertebrados tienen al menos tres homólogos del gen *hedgehog de Drosophila: sonic hedgehog (shh)* (erizo sónico), *desert hedgehog (dhh)* (erizo del desierto) *e indian hedgehog (ihh)* (erizo indio). La proteína Desert hedgehog es expresada en las células de Sertoli de los testículos, y los ratones homocigotos para un alelo null (nulo) de *dhh* presentan una espermatogénesis defectuosa. La proteína Indian hedgehog es expresada en el intestino y en el cartílago y es importante en el crecimiento óseo postnatal (Bitgood y McMahon 1995; Bitgood y col. 1996).

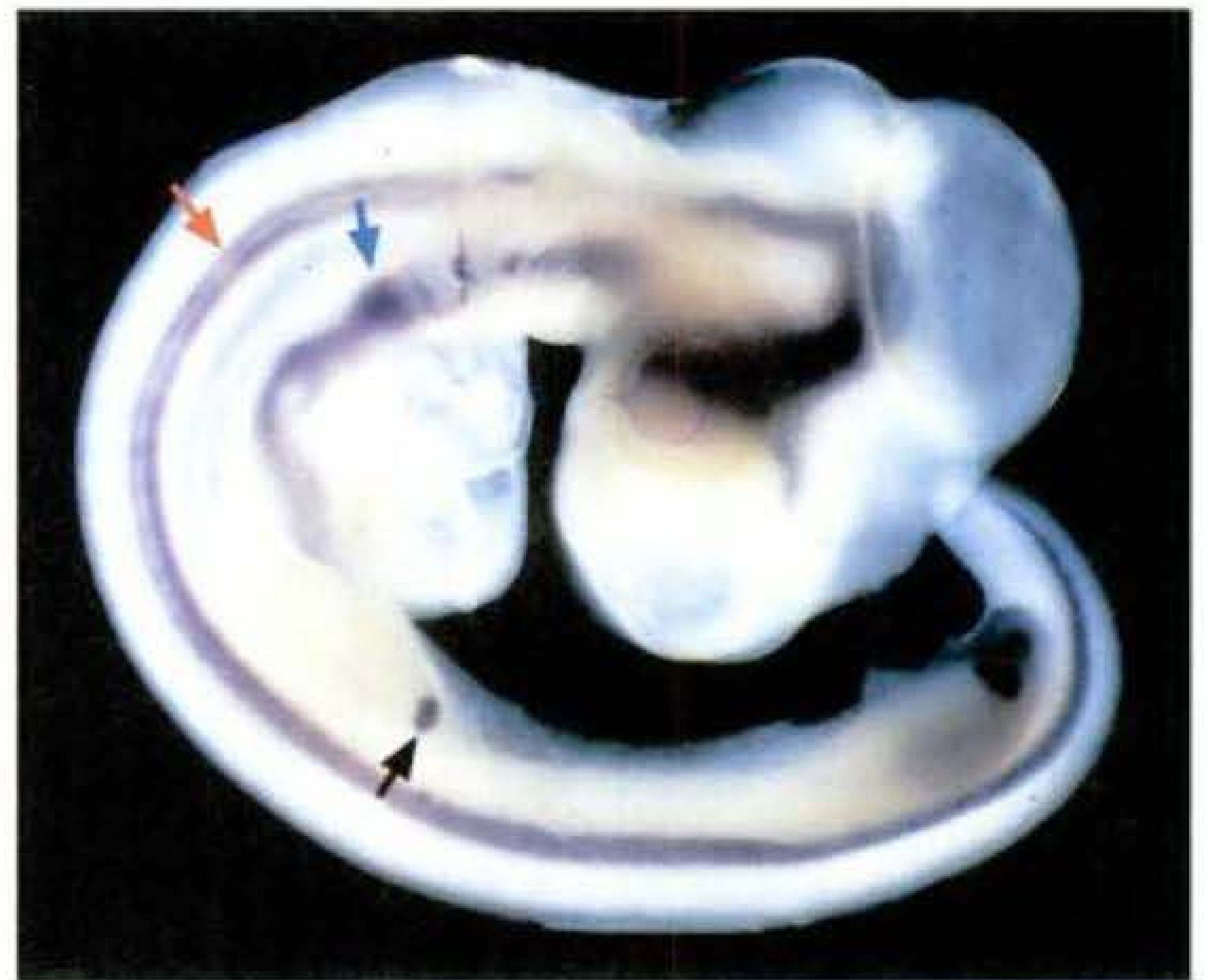
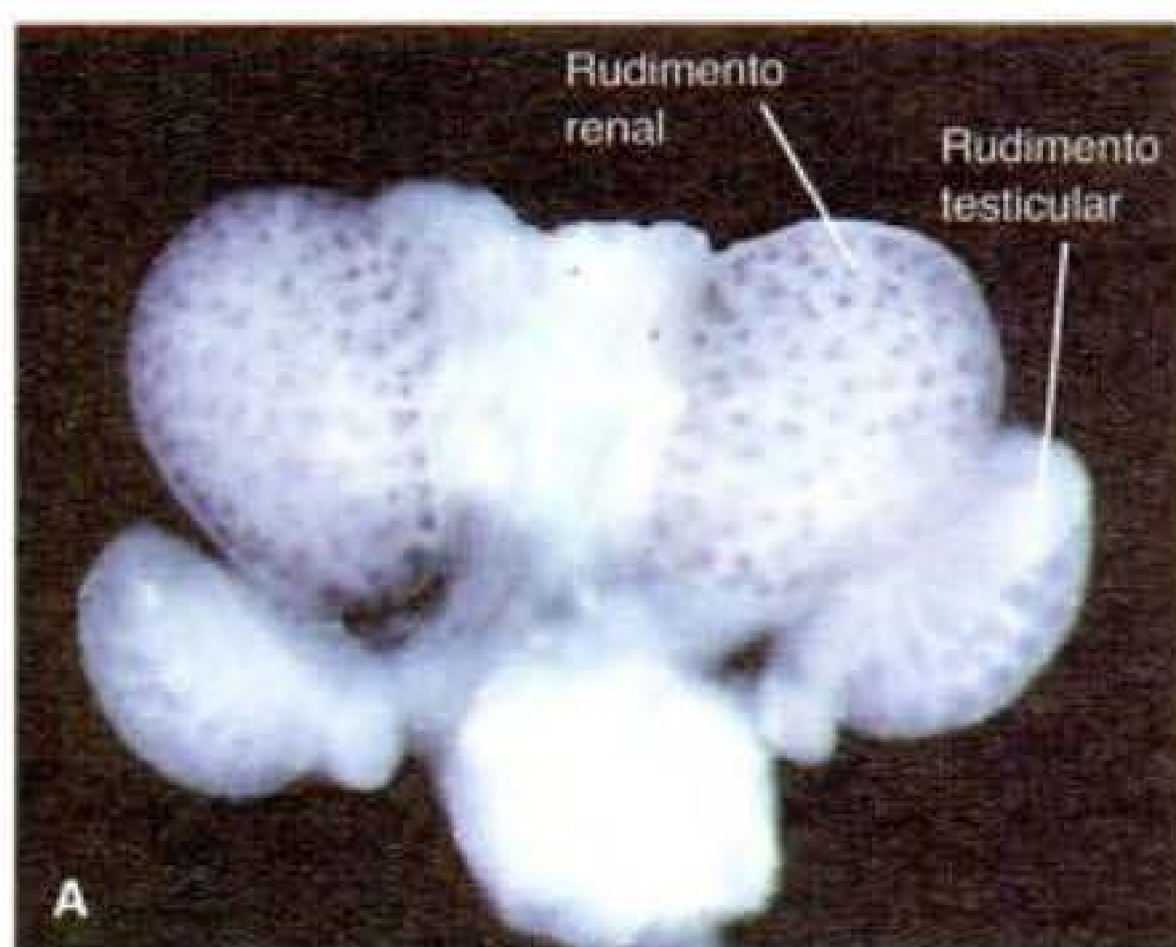


Fig. 6-12. Mediante hibridación in situ se muestra que el gen *sonic hedgehog* se expresa en el sistema nervioso (flecha roja), intestino (flecha azul) y esbozo del miembro (flecha negra) del pollo en un embrión de pollo de 3 días. (Fotografía cortesía de C. Tabin.)

Sonic hedgehog* tiene el mayor número de funciones de los tres homólogos de vertebrados. Producido por la notocorda, es procesado de modo tal que sólo son secretados los dos tercios del amino terminal de la molécula. Este péptido es responsable en el establecimiento del patrón del tubo neural de modo tal que las neuronas motoras son formadas a partir de neuronas ventrales y las neuronas sensoriales son formadas a partir de neuronas dorsales (véase cap. 12; Yamada y col. 1993). Sonic hedgehog también es responsable en el establecimiento del patrón de los somitas de modo tal que la porción del somita más cercana a la notocorda se convierte en el cartílago de la columna vertebral (Fan y Tessier-Lavigne 1994; Johnson y col. 1994). Como se verá en capítulos posteriores, se ha demostrado que Sonic hedgehog actúa como mediador en la formación del eje izquierda-derecha en pollos, inicia el eje anterior-posterior en los miembros, induce la diferenciación regional específica del tubo digestivo, e induce la formación de plumas (fig. 6-12; véase también fig. 6-6). Sonic hedgehog a menudo funciona con otros factores paracrinos, como las proteínas Wnt y FGF. En el diente en desarrollo, Sonic

* Es denominado así por el personaje de la Génesis de Sega. El gen *hedgehog* original fue hallado en *Drosophila*, en la que los genes son denominados después de sus fenotipos mutantes. La mutación de pérdida de función de *hedgehog* en *Drosophila* hace que el embrión de mosca se cubra con dentículas puntiagudas sobre su cutícula; por lo tanto, se parece a un erizo. Los genes *hedgehog* de vertebrados fueron descubiertos mediante la investigación de bibliotecas de genes de vertebrados (pollo, rata, pez cebra) con sondas que encontraron secuencias similares al gen *hedgehog* de la mosca de la fruta. Riddle y sus colegas en el laboratorio de Cliff Tabin (1993) descubrieron tres genes homólogos para *hedgehog* de *Drosophila*. Dos fueron denominados como las especies de erizo, el tercero fue llamado como el personaje del dibujo animado.



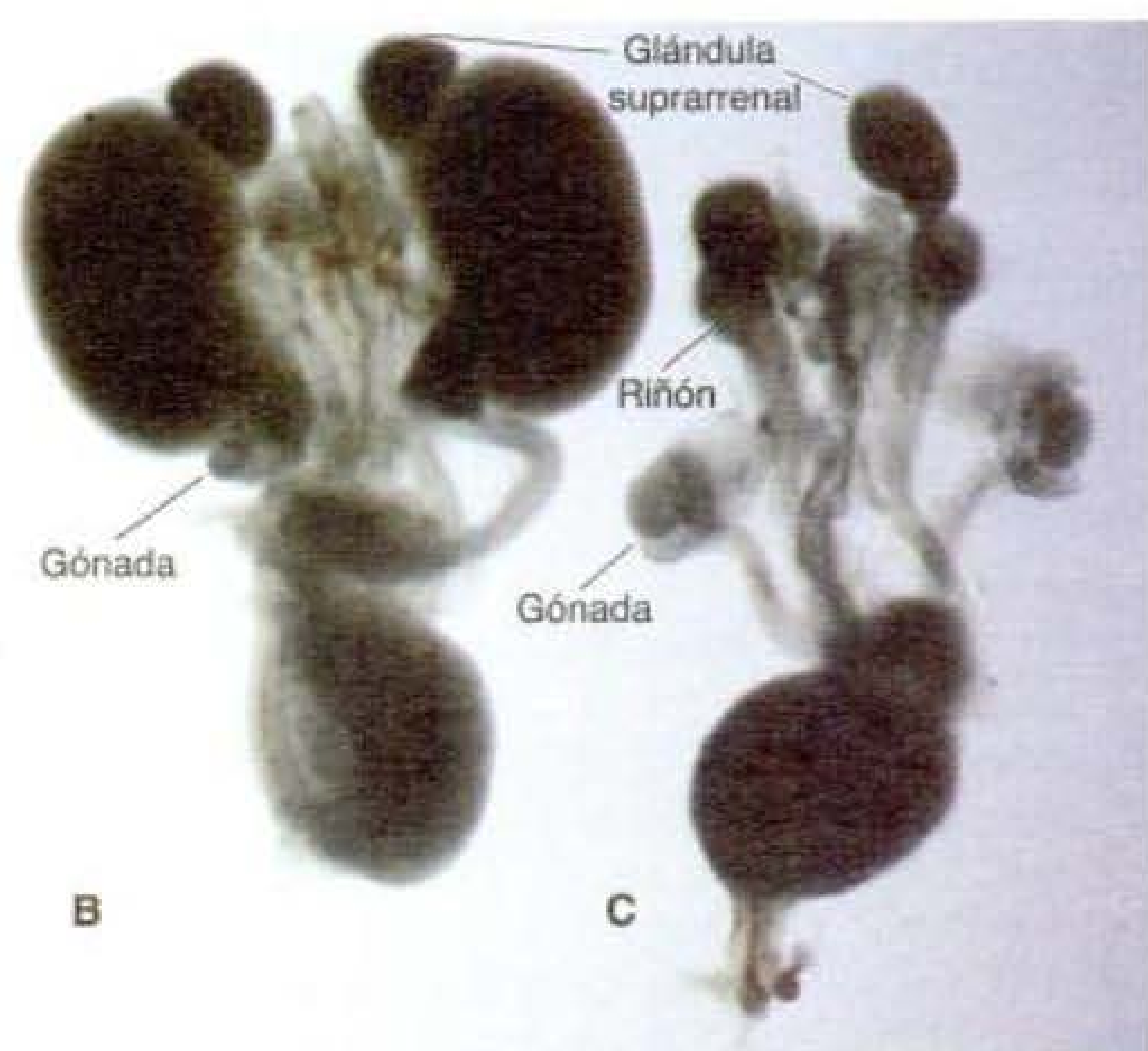


Fig. 6-13. Las proteínas Wnt cumplen varias funciones en el desarrollo de los órganos urogenitales. Wnt4 es necesario para el desarrollo del riñón y para la determinación sexual de la hembra. **A.** Hibridación in situ de embriones in toto (*whole-mount*) de la expresión de *Wnt4* en un rudimento urogenital de un embrión de ratón macho de 14 días. La expresión (tinción violeta-azul oscuro) es vista en el mesénquima que se condensa para formar los nefrones del riñón. **B.** El rudimento urogenital de un ratón hembra tipo salvaje recién nacido. **C.** El rudimento urogenital de un ratón hembra recién nacido con el knockout del gen Wnt4 muestra que los riñones no se desarrollan. Además, los ovarios comienzan a sintetizar testosterona y llegan a rodearse de un sistema de conductos masculino modificado. (Fotografías cortesía de J. Perasaari y S. Vainio.)

hedgehog, FGF4, y otros factores paracrinos son concentrados en la región en donde las interacciones celulares están creando las cúspides o capuchones de los dientes (véase fig. 13-9; Vaahtokari y col. 1996a)

> SITIO WEB 6-3 **Funciones de la familia Hedgehog** (Functions of the Hedgehog family). Mientras que las proteínas Sonic hedgehog inducen y especifican numerosos tejidos en el embrión, Indian hedgehog y Desert hedgehog funcionan posnatalmente para regular el crecimiento óseo y la producción de espermatozoides.

La familia Wnt

Los Wnts constituyen una familia de glucoproteínas ricas en cisteína. En vertebrados hay al menos 15 miembros de esta familia. Su nombre es una fusión del nombre del gen de polaridad de segmento de *Drosophila wingless* (sin alas) con el nombre de uno de sus homólogos de vertebrados, *integrated* (integrado). Mientras que Sonic hedgehog es importante en el establecimiento del patrón de la porción ventral de los somitas (provocando que las células se conviertan en cartílago), Wnt1 parece ser activo en la inducción de las células dorsales de los somitas para llegar a convertirse en músculo y está involucrado en la especificación de las células del cerebro medio (McMahon y Bradley 1990; Stern y col. 1995). Las proteínas Wnt también son críticas en el establecimiento de la polaridad de los miembros de insectos y de vertebrados, y ellas son utilizadas en varias etapas del desarrollo del sistema urogenital (fig. 6-13).

> SITIO WEB 6-4 **Wnts: una familia ancestral (Wnts: An ancient family).** La bioquímica de las proteínas Wnt y los mecanismos de sus acciones son un cuento fascinante del tema y de sus variaciones. La familia Wnt puede ser uno de los grupos más antiguos de moléculas de señalización en el reino animal.

La superfamilia TGF-β

Hay cerca de 30 miembros de la superfamilia TGF-β* relacionados estructuralmente, y regulan algunas de las interacciones de desarrollo más importantes (fig. 6-14). Las proteínas codificadas por los genes de la superfamilia TGF-β son procesadas de modo tal que la región carboxilo terminal contiene al péptido maduro. Estos péptidos son dimerizados en homodímeros (con sí mismos) o heterodímeros (con otros péptidos de TGF-β) y son secretados de la célula. La superfamilia TGF-β incluye a la familia de TGF-β, la familia de activina, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), la familia Vg1, y otras proteínas relacionadas, incluyendo el factor neurotrófico derivado glial (necesario para la diferenciación del riñón y de la neurona entérica) y el factor inhibidor de Müller (que está involucrado en la determinación del sexo en mamíferos).

Los miembros de la familia TGF-β1, 2, 3 y 5 son importantes en la regulación de la formación de la matriz extracelular entre las células y para regular la división celular (positiva y negativamente). TGF-β1 incrementa la cantidad de matriz extracelular que producen las células epiteliales (mediante la estimulación de la síntesis de colágeno y de fibronectina y por la inhibición de la degradación de la matriz). Las proteínas TGF-β pueden

* TGF se refiere a "factor de crecimiento transformador". La designación de "superfamilia" es a menudo dada cuando cada una de las diferentes clases de moléculas constituye una "familia." Todos los miembros de una superfamilia tienen estructuras similares, pero no son tan cercanos como lo están una de la otra las moléculas dentro de una misma familia.

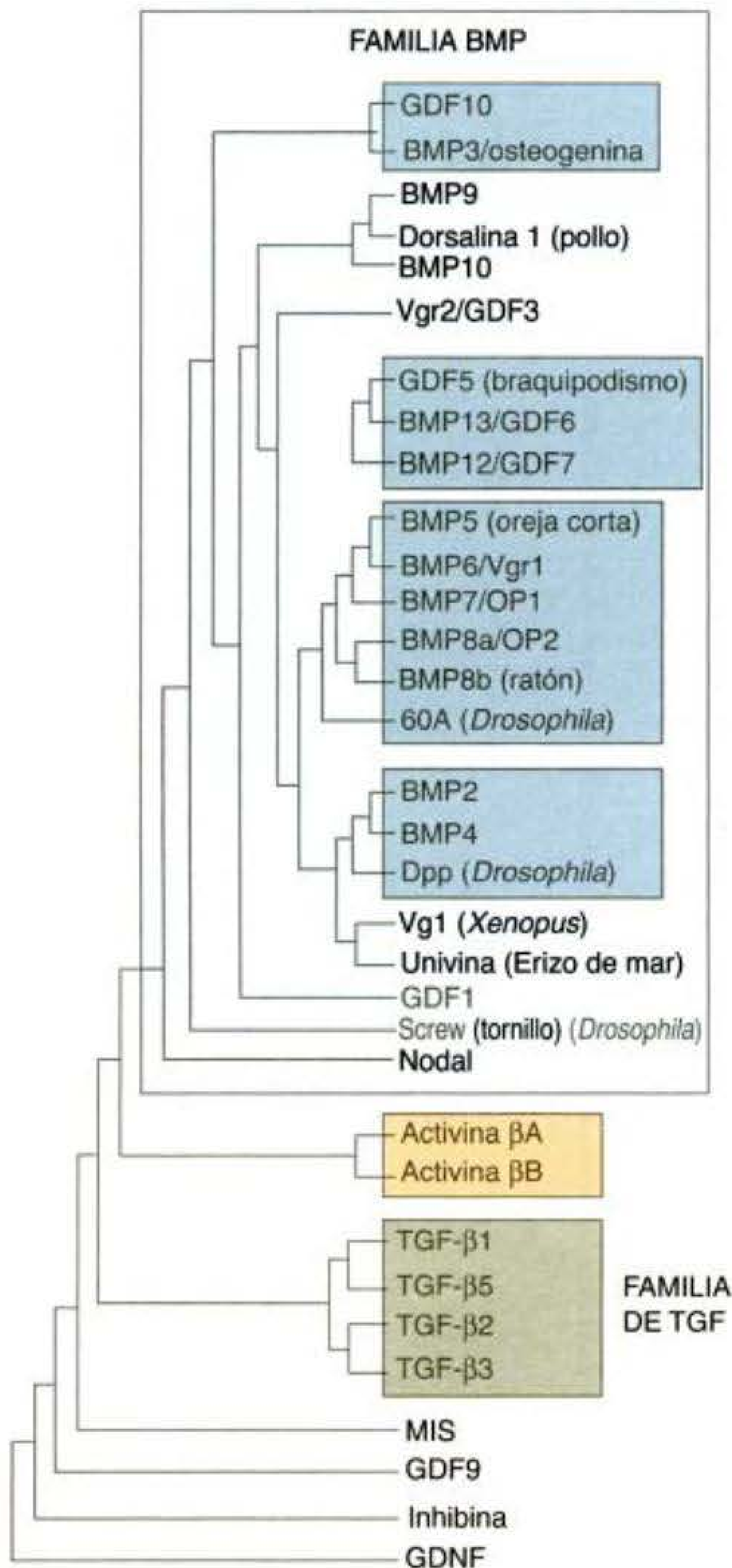


Fig. 6-14. Relaciones entre los miembros de la superfamilia TGF-β. (Según Hogan 1996.)

ser críticas en controlar dónde y cuándo se ramifica el epitelio para formar los conductos renales, pulmonares y de las glándulas salivales (Daniel 1989; Hardman y col. 1994; Ritvos y col. 1995). Los efectos de los miembros individuales de la familia TGF-β son difíciles de clasificar, debido a que los miembros de la familia TGF-β parecen funcionar del mismo modo y pueden compensar la pérdida de otros cuando son expresados conjuntamente. Además, la inactivación génica *knockout*) en ratones del gen *Tgf-β1* es difícil de interpretar, debido a que la madre puede suministrar este factor a través de la placenta y la leche (Letterio y col. 1994).

Los miembros de la familia BMP fueron descubiertos originalmente por su capacidad para inducir la formación de hueso; por lo tanto, ellos son conocidos como **proteínas morfogenéticas del hueso**. Sin embargo, la formación de hueso es solo una de sus múltiples funciones. Se ha encontrado que ellos regulan la división celular, la apoptosis (muerte celular programada), la migración celular y la diferenciación (Hogan 1996). Las BMP pueden ser distinguidas de otros miembros de la superfamilia de TGF-β debido a que tienen en el polipéptido maduro siete (en lugar de nueve) cisteínas conservadas. Las BMP incluyen proteínas como Nodal (responsable de la formación del eje izquierda-derecha) y BMP7 (importante en la polaridad del tubo neural, desarrollo renal y formación de espermatozoides; véase fig. 4-22). Así resulta que BMP1 no es un miembro de la familia de BMP en absoluto; es una proteasa.

La proteína Decapentaplégica de *Drosophila* es homóloga a la de BMP4 de vertebrados, y la de BMP4 humano puede sustituir al homólogo de *Drosophila*, rescatando a aquellas moscas deficientes de Dpp (Padgett y col. 1993). Se cree que las BMP funcionan por difusión desde las células que las producen. Su alcance es determinado por el aminoácido en la región N-terminal, que determina si el BMP específico se unirá a los proteoglucanos, restringiendo de este modo su difusión (Ohkawara y col. 2002).

Otros factores paracrinos

Aunque la mayoría de los factores paracrinos son miembros de las cuatro familias antes mencionadas, algunos tienen pocos o ningún pariente cercano. Los factores como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de hepatocitos, las neurotrofinas y los factores de célula madre no están incluidos dentro de estas familias, pero juegan importantes papeles durante el desarrollo. Además, hay numerosos factores involucrados casi exclusivamente en el desarrollo de las células sanguíneas: estos factores serán discutidos cuando se vea minuciosamente la formación de las células sanguíneas en el capítulo 14.

Receptores de superficie celular y sus vías de transducción de la señal

A continuación se pasará de los factores paracrinos, que son inductores proteicos, a las moléculas involucradas en la respuesta de la inducción. Estas moléculas incluyen a receptores que unen al factor paracrino y que están localizados en la membrana de la célula que responde; y la cascada de proteínas que interactúan que transmiten una señal a través de una vía desde el receptor hasta el núcleo. Estas vías entre la membrana celular y el genoma son denominadas **vías de transducción de la señal.** Se han descubierto varios tipos de vías de transducción de la señal; se resumirán aquí algunas de las principales.

Como se verá, las principales vías de transducción de la señal parecen ser todas variaciones sobre un tema común y bastante elegante. Cada receptor abarca la membrana celular y tiene una región extracelular, una región transmembrana, y una región citoplasmática. Cuando un ligando (el factor paracrino) se une a su receptor en la región extracelular, el ligando induce un cambio conformacional en la estructura del receptor. Este cambio de forma es transmitido a través de la membrana y cambia la forma de los dominios citoplasmáticos. El cambio conformacional en el dominio citoplasmático les otorga actividad enzimática, generalmente una actividad

Cuadro 6-2 *Una clasificación de los factores de transcripción basada en sus modos de activación*

Grupo	*Ejemplos*
CONSTITUTIVO	Sp1, NF1, otros factores asociados con TBP
REGULATORIO (CONDICIONAL)	
De desarrollo (activos en las células que los adquieren por localización citoplasmática o por inducción)	GATA4 (sangre) Pit1 (hipófisis) MyoD, Myf (músculos) Proteínas Hox (ejes corporales) Bicoid (segmentos anteriores de *Drosophila*) Pax6 (ojo, páncreas)
Señal dependiente (no son activos a menos que sea dada una señal a la célula)	Familia de receptores de esteroides (estrógeno, testosterona, retinoides, hormona tiroidea) Receptor dependiente de la superficie celular (STAT, SMAD, β-catenina, GLI, MITF, etc.)

Fuente: Según Brivanlou y Darnell 2002.

de cinasa que puede utilizar ATP para fosforilar las proteínas, incluyendo al receptor de la molécula mismo. El receptor activo puede ahora catalizar reacciones que fosforilan a otras proteínas, y esta fosforilación a su vez activa a sus actividades latentes. Finalmente, la cascada de fosforilación activa a un factor de transcripción inactivo, que activa (o reprime) a un grupo de genes.

Por lo tanto, los factores de transcripción han sido divididos en tres categorías (cuadro 6-2; Brivanlou y Darnell 2002). El primer grupo incluye a aquellos factores de transcripción que están presentes constitutivamente en todas las células. Éstos incluyen a los factores de tanscripción basales. El segundo grupo incluye a aquellos factores de transcripción que son activos siempre que una célula los adquiera por la localización citoplasmática (p. ej., Bicoid) o por inducción (Pax6). El tercer grupo incluye a aquellos factores de transcripción (como MITF) cuyas funciones son activadas por las vías de señalización de la célula.

Vía del receptor de tirosina cinasa (RTK)

La señal de la vía de transducción del RTK (del inglés: *receptor tyrosine kinase*) fue uno de los primeros caminos para unir varias áreas de la biología del desarrollo. Los investigadores que estaban estudiando los ojos de *Drosophila*, la vulva del nematodo y los cánceres humanos se dieron cuenta de que todos ellos estaban estudiando los mismos genes. La vía RTK comienza en la superficie celular, donde un **receptor de tirosina cinasa (RTK)** une su ligando específico. Los ligandos que se unen a los RTK incluyen los factores de crecimiento fibroblástico, los factores de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento derivado de plaquetas y los factores de células madre. Cada RTK puede unir solo uno o un pequeño grupo de estos ligandos. (P. ej., el factor de célula madre se unirá sólo a un RTK, la proteína Kit.) El RTK abarca la membrana celular, y cuando se une su ligando, experimenta un cambio conformacional que le permite dimerizarse con otro RTK. Este cambio conformacional estimula la actividad de cinasa latente de cada RTK, y estos receptores se fosforilan entre sí sobre residuos de tirosina específicos (véase fig. 6-10). Por lo tanto, la unión del ligando al receptor provoca la autofosforilación del dominio citoplasmático del receptor.

La tirosina fosforilada sobre el receptor es luego reconocida por una proteína adaptadora (fig. 6-15). La proteína adaptadora sirve como puente que conecta al RTK fosforilado con un poderoso sistema de señalización intracelular. Mientras se une al RTK fosforilado a través de uno de sus dominios citoplasmáticos, la proteína adaptadora también activa a una **proteína G**, tal como **Ras.** Normalmente, la proteína G se encuentra en un estadio inactivo con GDP unido. El receptor activado estimula a la proteína adaptadora a activar el **factor liberador de nucleótido de guanina (GNRP,** del inglés: *guanine nucleotide releasing factor*). Esta proteína intercambia un fosfato de un GTP para transformar el GDP unido en GTP. La proteína G con GTP unido es una forma activa que transmite la señal a la siguiente molécula. Después que la señal es emitida, el GTP sobre la proteína G es hidrolizado retornando a GDP. Esta catálisis es ampliamente estimulada por los complejos de la proteína Ras con la **proteína GTPasa activadora (GAP**, del inglés: *GTPase-activating protein*). En esta vía, la proteína G es regresada a su estadio inactivo, en donde puede aguardar por señales posteriores. Sin la proteína GAP, la proteína Ras no puede catalizar bien el GTP, y permanece en su configuración activa (Cales y col. 1988; McCormick 1989). Las mutaciones en el gen *RAS* explican una gran proporción de los tumores cancerosos humanos (Shih y Weinberg 1982), y las mutaciones de *RAS* que lo hacen oncogénico inhiben en todos los casos la unión de la proteína GAP.

La proteína G Ras activa se asocia con una cinasa denominada Raf. La proteína G recluta a la proteína Raf inactiva hacia la membrana celular, donde se vuelve activa (Leever y col. 1994; Stokoe y col. 1994). La proteína Raf es una cinasa que activa la proteína MEK mediante su fosforilación. MEK es a su vez una cinasa, que activa la proteína ERK por fosforilación. Por su parte, ERK es una cinasa que ingresa al núcleo y fosforila ciertos factores de transcripción.

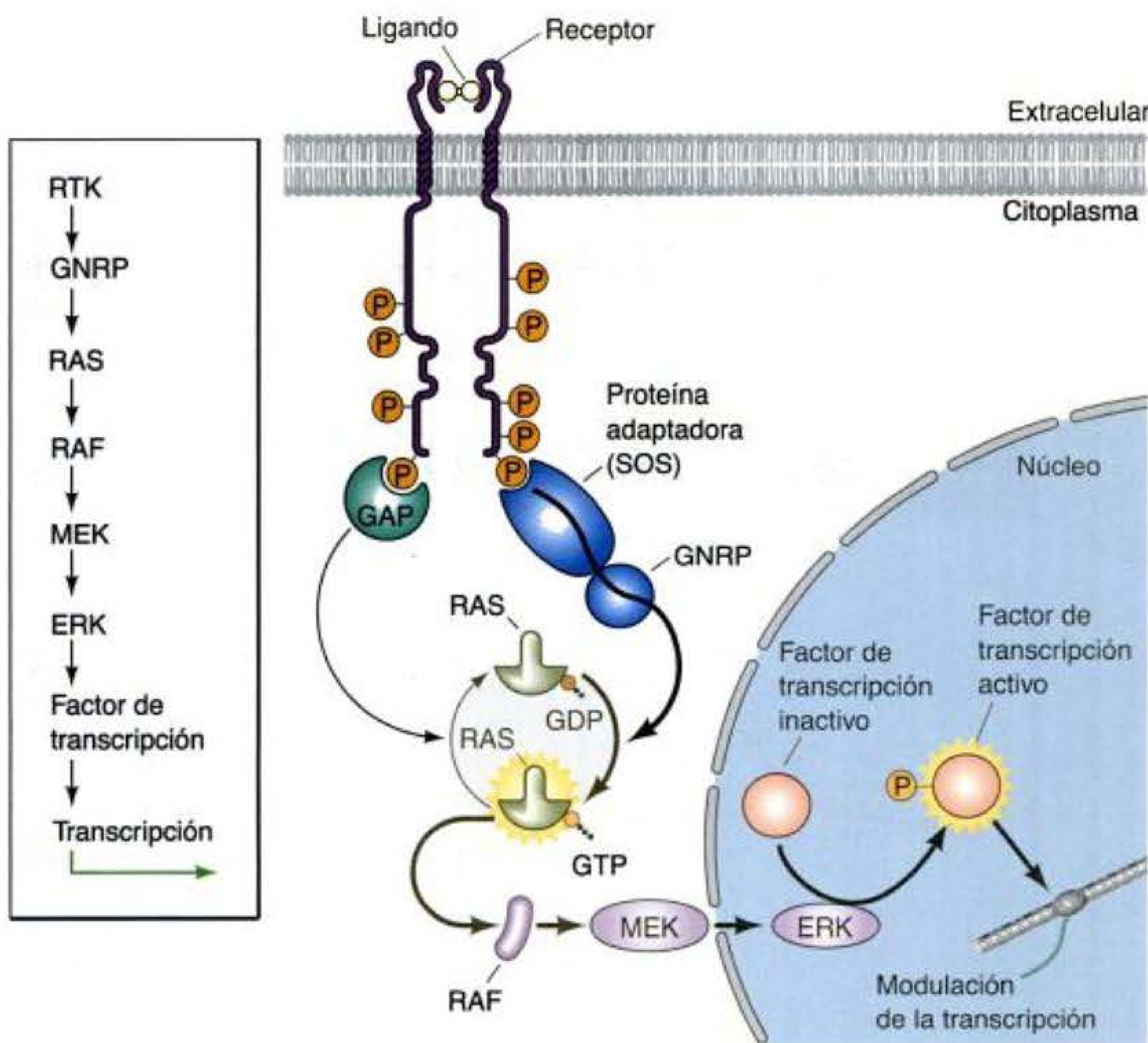


Fig. 6-15. Vía de transducción de señal del RTK ampliamente usada. El receptor tirosina cinasa es dimerizado por el ligando, que provoca la autofosforilación del receptor. La proteína adaptadora reconoce las tirosinas fosforiladas sobre el RTK y activa a una proteína intermediaria, GNRP, que activa a la proteína G Ras al permitir la fosforilación de GDP unido a Ras. Al mismo tiempo, la proteína GAP estimula la hidrólisis de este fosfato unido, retornando a Ras a su estado inactivo. La Ras activa puede activar la proteína cinasa C Raf (PKC), que a su vez fosforila a una serie de cinasas. Finalmente, la cinasa ERK activada altera la expresión del gen en el núcleo de la célula que responde mediante la fosforilación de ciertos factores de transcripción (que puede luego ingresar en el núcleo para cambiar los tipos de genes transcriptos) y ciertos factores de traducción (que alteran el nivel de síntesis de proteína). En muchos casos, esta vía es reforzada por la liberación de iones de calcio. Una versión simplificada de la vía se representa sobre la izquierda.

Información adicional y especulaciones

La vía del RTK y la inducción célula-a-célula

Las investigaciones recientes sobre el desarrollo de *Drosophila* y de *Caenorhabditis elegans* han demostrado que esta inducción ocurre de hecho a nivel célula-a-célula. Algunos de los ejemplos mejor estudiados involucran la formación de los fotorreceptores de la retina en el ojo de *Drosophila* y la formación de la vulva en *C. elegans*. Sorprendentemente, la vía de transducción de la señal implicada resultó ser la misma en ambos casos; solamente son diferentes los factores de transcripción dirigidos contra el objetivo. En ambos casos, un inductor símil factor de crecimiento activa a la vía RTK.

Inducción del fotorreceptor en Drosophila

La retina de *Drosophila* consiste en cerca de 800 unidades denominadas **omatidios** (fig. 6-16). Cada omatidio está compuesto de 20 células organizadas en un patrón preciso. Ocho de aquellas células son fotorreceptores; el resto son células del cristalino. El ojo se desarrolla en la capa epitelial plana del disco imaginal del ojo de la larva. No hay células directamente por arriba o por debajo de esta capa, de modo que las interacciones están reducidas a las células vecinas en el mismo plano. La diferenciación de estas células epiteliales organizadas azarosamente a células fotorreceptoras de la retina y a tejido del cristalino circundante se produce durante el último (tercero) estadio larval. Se forma una indentación en el margen posterior del disco imaginal y su *surco morfogenético* comienza a viajar avanzando hacia el margen anterior del epitelio (fig. 6-17). El movimiento del surco depende de las interacciones entre dos factores paracrinos, Hedgehog y Decapentaplegic. Hedgehog es expresado por las células inmediatamente posteriores al surco (es decir, aquellas que se acababan de diferenciar), y éste induce la expresión de la proteína Decapentaplegic dentro del surco (Heberlein y col. 1993; Ma y col. 1993). Por lo tanto, cuando las

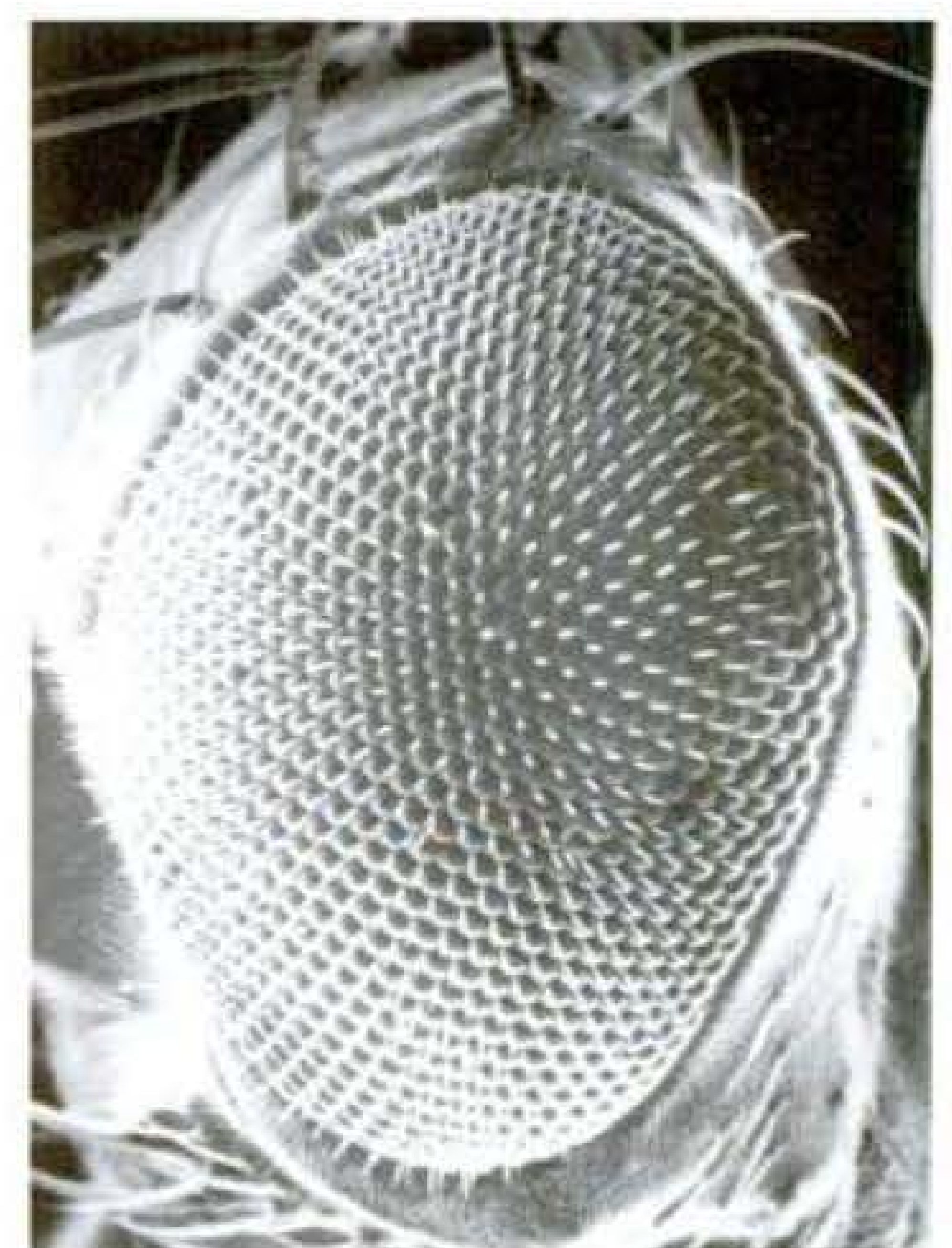


Fig. 6-16. Microfotografía electrónica de barrido de un ojo compuesto de *Drosophila*. Cada faceta es un único omatidio. Las cerdas sensoriales proyectan a partir de cada omatidio. (Fotografía cortesía de T. Venkatesh.)

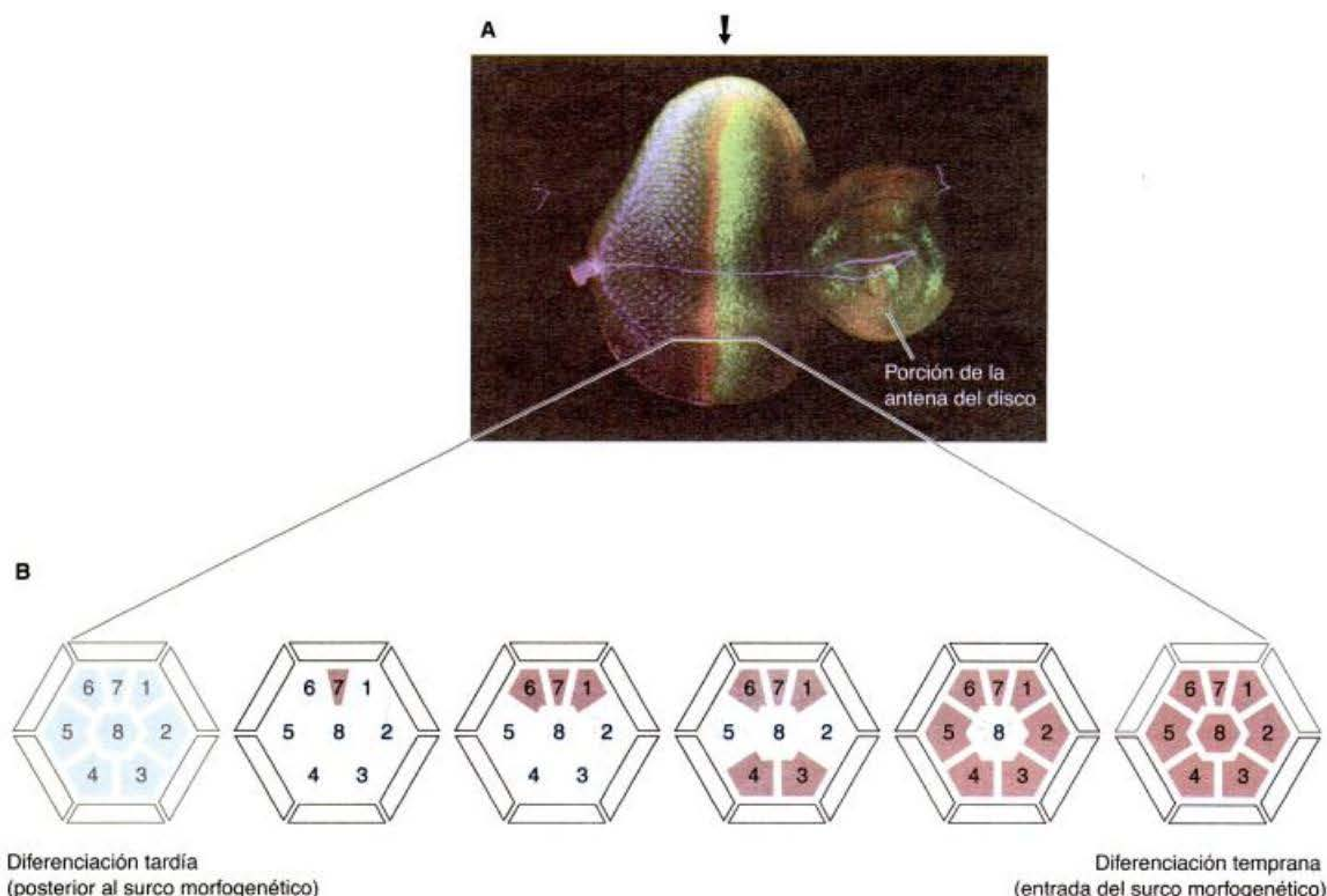


Fig. 6-17. Diferenciación de los fotorreceptores en el ojo compuesto de *Drosophila*. El surco morfogenético (flecha) cruza el disco imaginal desde posterior (izquierda) hacia anterior (derecha). **A.** Microfotografía confocal de un disco imaginal ojo/antena larval tardío triplemente marcado, mostrando la expresión de *hairy* en verde por delante del surco morfogenético (flecha). Dentro del surco, la proteína Ci (rojo) es expresada como consecuencia de la señal Hedgehog. (Ésta activará al gen *decapentaplegic*.) La proteína neural específica 22C10, es teñida de azul en los fotorreceptores que están diferenciándose detrás del surco morfogenético. (La línea azul horizontal de tinción es el nervio de Bolweg.) **B.** Detrás del surco, las células fotorreceptoras se diferencian en una secuencia definida. La primera célula fotorreceptora a diferenciarse es R8 (mostrada en azul). R8 parece inducir la diferenciación de R2 y R5, y una cascada de inducción continúa hasta que se ha diferenciado el receptor de R7. (**A**, fotografía cortesía de N. Brown, S. Paddock y S. Carroll; **B**, según Tomlinson 1988.)

células de la retina comienzan a diferenciarse detrás del surco, secretan la proteína Hedgehog, que conduce al surco anteriormente (Brown y col. 1995).

> VADE MECUM[2] **Discos imaginales de *Drosophila* (*Drosophila* imaginal discs).** Los discos imaginales son grupos de células larvales a partir de los cuales se forman las estructuras del adulto. Se puede disecar fácilmente el disco imaginal de la larva de *Drosophila* para ver por uno mismo el espléndido disco ojo-antena. Este segmento muestra cómo se hace. **[Hacer clic sobre Fruit Fly.]**

Cuando el surco morfogenético pasa a través de una región de células, esas células comienzan a diferenciarse en un orden específico. La primera célula en diferenciarse es el fotorreceptor central (R8) (Chen y Chien 1999). Las proteínas Hedgehog en la región del surco parecen inducir la determinación de R8 (Hsiung y Moses, 2002; Dokucu y col. 1996), y el fotorreceptor R8 expresa el factor de transcripción Atonal (al igual que las neuronas de la retina en vertebrados). Se piensa que la célula R8 induce a la célula anterior a ésta y a la célula posterior a ésta (con respecto al surco) a convertirse en los fotorreceptores R2 y R5, respectivamente. Los fotorreceptores R2 y R5 son funcionalmente equivalentes, de modo que la señal desde R8 es probablemente la misma para ambas células (Tomlinson y Ready 1987). Las señales a partir de estas células inducen a cuatro células adyacentes más a convertirse en los fotorreceptores R3, R4, y luego en R1 y R6. Por último, aparece el fotorreceptor R7. Las otras células alrededor de estos fotorreceptores se convierten en células del cristalino. La determinación del cristalino es la condición "por defecto" si las células no son inducidas.

Ha sido encontradas una serie de mutaciones que bloquean alguna de las etapas de la cascada de inducción. Las mutaciones en el gen *sevenless* (*sev*) o en el gen *bride* de *sevenless* (*boss*) pueden, cada una de ellas, impedir la diferenciación de la célula R7 a fotorreceptor. (Ésta en su lugar se convierte en una célula del cristalino). El análisis de estas mutaciones ha mostrado que ellas afectan los procesos inductivos. El gen *sev* es requerido en la célula R7 misma. Si se producen embriones mosaico de modo tal que algunas de las células del disco imaginal del ojo son heterocigotas (normal) y algunas son homocigotas para la mutación *sevenless*, el fotorreceptor R7 se desarrolla solamente si el precursor celular de R7 tiene el alelo *sev*

tipo salvaje (Basler y Hafen 1989; Bowtell y col. 1989). Los anticuerpos para la proteína Sevenless la han encontrado en la membrana celular, y la secuencia del gen *sev* sugiere que éste codifica una proteína de transmembrana con un sitio tirosina cinasa en su dominio citoplasmático (Banerjee y col. 1987; Hafen y col. 1987). Este hallazgo es consecuente con el hecho de que la proteína es un receptor para alguna señal: un RTK.

La señal que le indica al precursor R7 a diferenciarse en un fotorreceptor R7 viene de una proteína codificada por el gen *boss* tipo salvaje. Las moscas homocigotas para la mutación *boss* también carecen de fotorreceptores R7. Los estudios de mosaicos genéticos en los que algunas de las células del disco imaginal del ojo son normales y algunas son homocigotas para la mutación *boss* muestran que el gen *boss* tipo salvaje no es necesario en el precursor de R7 mismo. En su lugar, el fotorreceptor se diferencia solamente si el gen *boss* tipo salvaje es expresado en la célula R8. Por lo tanto, el gen *boss* codifica una proteína cuya existencia en la célula R8 es necesaria para la diferenciación de la célula R7.

En realidad, la proteína Boss es el ligando para el RTK Sev. Boss probablemente funciona de un modo yuxtacrino (permanece unida a la célula R8), con su dominio de unión extracelular para el dominio extracelular de Sev (Reinke y Zipursky 1988; Hart y col. 1993). En los ojos de *Drosophila*, la cascada RTK iniciada por la unión de Boss a Sev activa al factor de transcripción Sevenless-Absentia (Sina), cuya actividad es necesaria para la diferenciación del fotorreceptor R7 (Carthew y Rubin 1990; Dickson y col. 1992). Una vez que R7 es inducido, éste induce recíprocamente la expresión de las proteínas opsina en la célula R8 (Chou y col. 1999). Un resumen de algunas de las inducciones célula-a-célula en la retina de *Drosophila* (fig. 6-18) muestra que las células individuales son capaces de inducir a otras células individuales para crear la precisa organización de las células en tejidos específicos.

SITIO WEB 6.5 **Formación del ojo: una vía conservada (Eye formation: A conserved pathway).** Las proteínas de la vía Sevenless no son vistas solamente en el desarrollo de los omatidios, sino también en el desarrollo del ojo de los vertebrados. Esto parece ser una vía sorprendentemente conservada para la diferenciación del fotorreceptor. Además, parece ser un "protector" que impide a la célula R8 inducir la diferenciación de R7 en otras células omatidias.

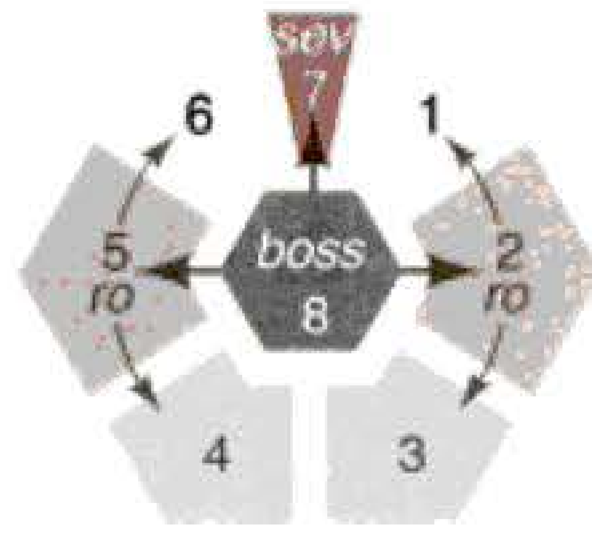


Fig. 6-18. Resumen de los principales genes que se conoce están involucrados en la inducción de los fotorreceptores en *Drosophila*. Para que el desarrollo continúe más allá de la diferenciación de los fotorreceptores R8, R2 y R5, el gen *rough* (*ro*) debe estar presente en las células R2 y R5. Para la diferenciación del fotorreceptor R7, el gen *sevenless* (*sev*) tiene que estar activo en la célula precursora de R7, mientras que el gen *bride* de *sevenless* (*boss*) debe estar activo en el fotorreceptor R8. (Según Rubin 1989.)

Inducción de la vulva en Caenorhabditis elegans

La mayoría de los individuos de *Caenorhabditis elegans* son hermafroditas. En su desarrollo temprano, son machos, y la gónada produce espermatozoides, que son almacenados para su uso posterior. Cuando se vuelven más viejos, desarrollan ovarios. Los huevos (gametos femeninos) "van rodando" hacia la región de almacenaje de espermatozoides, son fecundados dentro del nematodo, y luego pasan hacia el exterior del cuerpo a través de la vulva (véase fig. 8-43).

La vulva de *C. elegans* representa un caso en el que una señal inductiva genera una variedad de tipos celulares. Este órgano se forma durante el estado larval a partir de seis células denominadas **precursores celulares de la vulva** (**VPC** del inglés, *vulval precursor cells*). La célula que conecta el revestimiento de la gónada con las células precursoras de la vulva es denominada **célula ancla o de sostén**. La célula ancla secreta la proteína LIN-3, un pariente del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés: *epidermal growth factor*) y de la proteína Boss (Hill y Sternberg 1992). Si la célula ancla es destruida (o si el gen *lin-3* está mutado), las VPC no formarán una vulva; en su lugar llegarán a formar parte de la hipodermis (piel) (Kimble 1981).

Las seis VPC influenciadas por la célula ancla forman un **grupo de equivalencia.** Cada miembro de este grupo es competente para llegar a ser inducido por la célula ancla y puede asumir cualquiera de los tres destinos, dependiendo de su proximidad a la célula ancla (fig. 6-19). La célula directamente debajo de la célula ancla se divide para formar las células centrales de la vulva. Las dos células localizadas a los lados de esta célula central se dividen para convertirse en células laterales de la vulva, mientras que las tres células más alejadas de la célula ancla generan células hipodérmicas. Si la célula ancla es destruida, las seis células del grupo de equivalencia se dividen una vez y contribuyen al tejido hipodérmico. Si las tres VPC centrales son destruidas, las tres células externas, que normalmente forman células hipodérmicas, generan en su lugar células de la vulva. La proteína LIN-3 es reconocida sobre las VPC por el receptor de tirosina cinasa LET-23, y la señal es transferida al núcleo a través de la vía del RTK. El blanco de interés de la cascada de la cinasa es la proteína LIN-31 (Tan y col. 1998). Cuando esta proteína es fosforilada en el núcleo, pierde su proteína inhibitoria compañera y es capaz de funcionar como un factor de transcripción, promoviendo los destinos celulares de la vulva.

Dos mecanismos coordinan la formación de la vulva con esta inducción (fig. 6-20D; Katz y Sternberg 1996):

1. La proteína LIN-3 forma un gradiente de concentración. De este modo, la VPC más cercana a la célula ancla (es decir, la célula P6.p) recibe las concentraciones más altas de la proteína LIN-3 y genera las células centrales de la vulva. Las dos VPC adyacentes a ésta (P5.p y P7.p) reciben una cantidad más baja de LIN-3 y se convierten en las células laterales de la vulva. Las VPC más alejadas de la célula ancla no reciben suficiente LIN-3 como para que tenga un efecto, de modo tal que ellas se convierten en hipodermis (Katz y col. 1995).
2. Además de formar el linaje central de la vulva, la VPC más cercana a la célula ancla también produce señales lateralmente para las dos células adyacentes y las instruye para que no generen las células

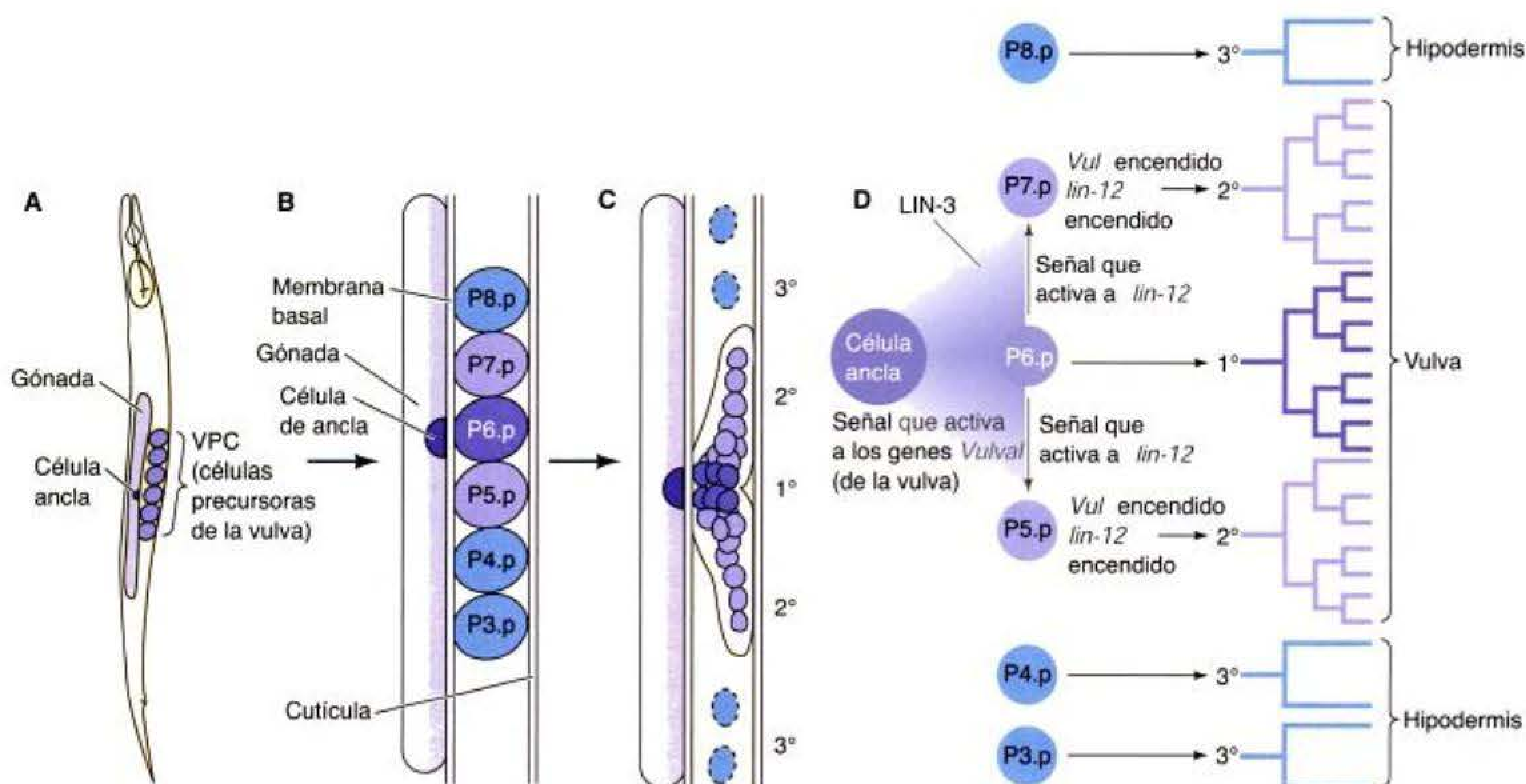


Fig. 6-19. Las células precursoras de la vulva de *C. elegans* y sus descendientes. **A.** Localización de la gónada, de la célula ancla, y de las VPC en la larva de segundo estado. **B, C.** Relaciones entre la célula ancla y las seis VPC y sus posteriores linajes. Los linajes 1° dan como resultado a las células centrales de la vulva; los linajes 2° constituyen a las células laterales de la vulva; los linajes 3° generan las células hipodérmicas. **C.** Bosquejo de la vulva en la larva de cuarto estado. Los círculos representan las posiciones de los núcleos. **D.** Modelo para la determinación de los linajes celulares de la vulva en *C. elegans*. La señal LIN-3 desde la célula ancla provoca la determinación de la célula P6.p para generar el linaje central de la vulva (violeta oscuro). Bajas concentraciones de LIN-3 llevan a que las células P5.p y P7.p formen los linajes laterales de la vulva. La célula P6.p (linaje central) también secreta una señal yuxtacrina de corto alcance que induce en las células vecinas la activación de la proteína LIN-12 (Notch). Esta señal impide que las células P5.p y P7.p generen el linaje primario de las células centrales de la vulva. (Según Katz y Sternberg 1996.)

centrales de la vulva. Estas células laterales no instruyen a las VPC periféricas para que hagan algo, de modo tal que estas últimas se convierten en hipodermis (Koga y Oshima 1995; Simske y Kim 1995). Esta inhibición lateral de los precursores de la vulva "secundarios" por el VPC "primario" es llevada a cabo a través de las proteínas LIN-12 (las cuales se discuten más adelante meticulosamente; Sternberg 1988).

Ambos mecanismos funcionan durante el desarrollo normal. Como Kenyon (1995) observó, "juntos podrían producir las vulvas minúsculas siempre-perfectas por las que los *C. elegans* son tan famosos".

La vía RTK es crítica en numerosos procesos de desarrollo. En las células de la cresta neural en migración de humanos y ratones, la vía es importante en la activación del factor de transcripción microftalmia (Mitf) para producir las células pigmentadas. Mitf, cuyo mecanismo de acción fue descrito en el capítulo 5, es transcripto en la célula de melanoblasto formadora de pigmento que migra desde la cresta neural hacia la piel y en las células formadoras de melanina de la retina pigmentada. Pero no se ha hablado aún de cuáles son las proteínas que constituyen la señal para que este factor de transcripción pueda hacerse activo. La clave yace en dos ratones mutantes cuyos fenotipos se asemejan a aquellos de los ratones homocigotas para las mutaciones de *microftalmia*. Como en aquellos ratones, los ratones *White* (Blanco) homocigotas y los ratones *Steel* (acero) homocigotas son blancos debido a que sus células pigmentadas no han podido migrar. Tal vez los tres genes (*Mitf, Steel, y White*) se encuentran en la misma vía de desarrollo. En 1990, varios laboratorios demostraron que el gen *Steel* codifica una proteína paracrina denominada **factor de célula madre** (véase Witte 1990). El factor de célula madre se une y activa al receptor **Kit** de tirosina cinasa codificado por el gen *White* (Spritz y col. 1992; Wu y col. 2000). La unión del factor de célula madre al RTK Kit dimeriza la proteína Kit, provocando que éste se fosforile. Kit fosforilado activa la vía por la cual ERK fosforilado es capaz de fosforilar al factor de transcripción Mitf (Hsu y col. 1997; Hemesath y col. 1998). Únicamente la forma fosforilada de Mitf es capaz de unir la proteína histona acetiltransferasa p300/CBP que le permite activar la transcripción de genes que codifican tirosinasa y otras proteínas de la vía de formación de melanina (fig. 6-20; Price y col. 1998).

La vía Smad

Los miembros de factores paracrinos de la superfamilia de TGF-β activan a miembros de los factores de transcripción de la familia **Smad** (fig. 6-21; Heldin y col.

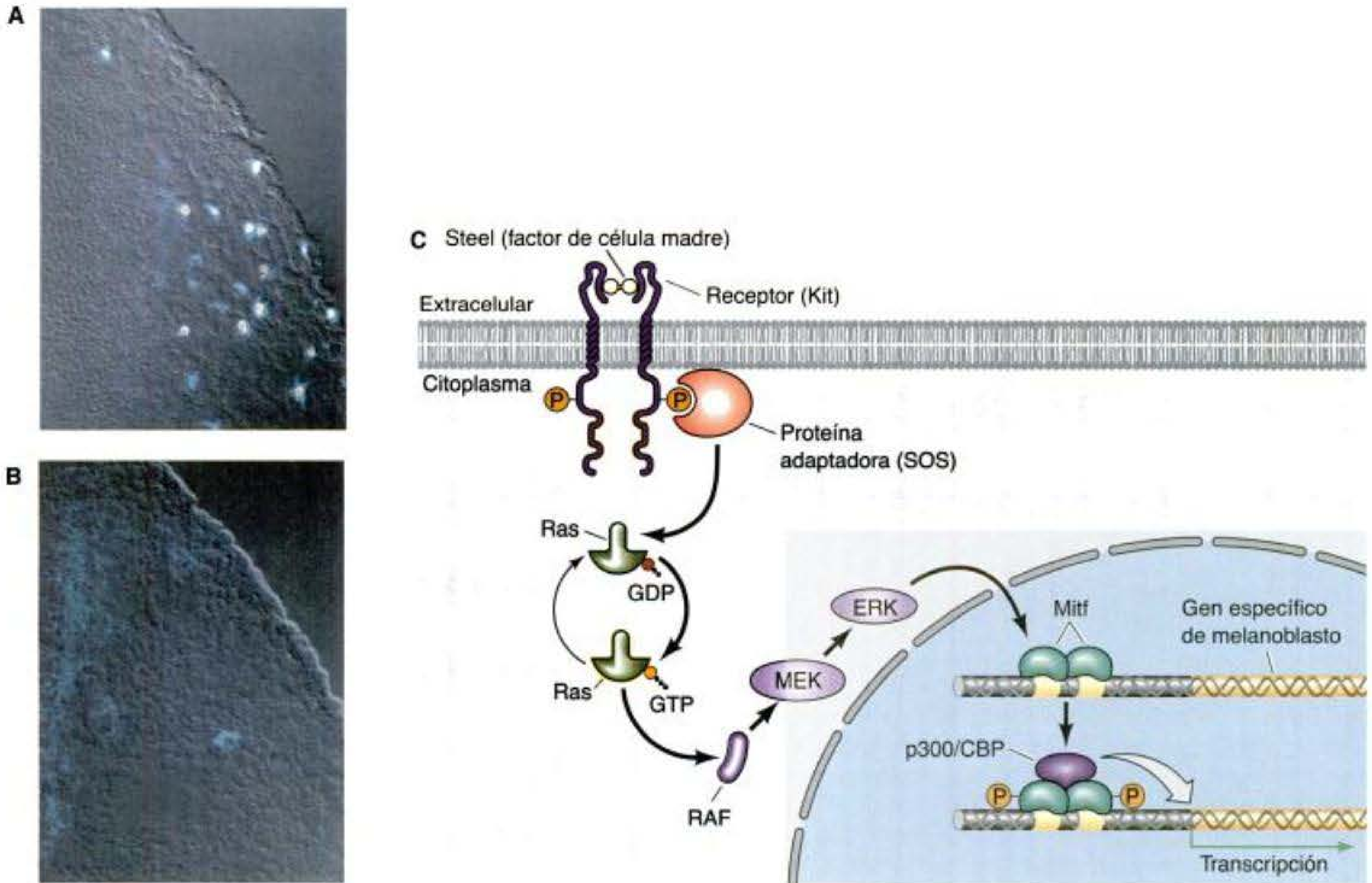


Fig. 6-20. Activación del factor de transcripción Mitf mediante la unión del factor de célula madre por la proteína RTK Kit. La información recibida en la membrana celular es enviada al núcleo por la vía de transducción de señal del RTK. **A, B.** Demostración que las proteínas Kit y Mitf están presentes en las mismas células. Los anticuerpos para estas proteínas tiñen la proteína Kit (rojo) y Mitf (verde). La superposición es amarilla o amarilla-verde. Ambas proteínas están presentes en las células migratorias precursoras de melanocitos (melanoblastos). **A.** El melanoblasto migratorio puede ser visto en un embrión de ratón tipo salvaje a los 10,5 días. **B.** Los melanoblastos no son visibles en los embriones mutantes de *microftalmia* de la misma edad. La carencia de melanoblastos en el mutante es debida a la relativa ausencia de Mitf. **C.** Vía de transducción de la señal que es conducida desde la membrana celular hacia el núcleo. Cuando el dominio receptor de la proteína RTK Kit une al factor paracrino Steel, Kit se dimeriza y se vuelve fosforilado. Esta fosforilación es utilizada para activar la proteína G Ras, que activa la cadena de cinasas que fosforilarán la proteína Mitf. Una vez fosforilada, Mitf puede unir el cofactor p300/CBP, acetilar las histonas de los nucleosomas, e iniciar la transcripción de los genes necesarios para el desarrollo de los melanocitos. (A, B, de Nakayama y col. 1998; fotografías cortesía de H. Arnheiter; C, según Price y col. 1998.)

1997). El ligando TGF-β se une al receptor tipo II de TGF-β, lo que le permite a este receptor unir a un receptor tipo I de TGF-β. Una vez que los dos receptores están en estrecho contacto, el receptor tipo II fosforila una serina o una treonina sobre el receptor tipo I, produciendo la activación de este último. El receptor tipo I activado ahora puede fosforilar a las proteínas Smad. (Los investigadores las denominan proteínas Smad por la fusión de los nombres de los primeros miembros de esta familia que fueron identificados: la proteína Sma de *C. elegans* y la proteína Mad de *Drosophila*.) Las Smads 1 y 5 son activadas por la familia BMP de los factores TGF-β, mientras que los receptores que unen activina y la familia TGF-β fosforilan a las Smads 2 y 3. Estas Smads fosforiladas se unen a Smad 4 y forman el complejo del factor de transcripción que ingresará al núcleo.

La vía JAK-STAT

Otra vía importante para la transducción de la información recibida a nivel de la membrana celular hacia el núcleo es la vía JAK-STAT. En este caso los factores de transcripción están compuestos por las proteínas STAT (transductoras de la señal y activadoras de la transcripción, del inglés: *signal transducers and activators of transcription*) (Ihle 1996; 2001). Las STAT son fosforiladas por algunas tirosinas cinasas, incluidos los receptores de factores de crecimiento fibroblástico y la familia JAK de tirosina cinasa. La vía JAK-STAT es extremadamente importante en la diferenciación de las células sanguíneas y en la activación del gen de la caseína durante la producción de leche (Briscoe y col. 1994; Groner y Gouilleux 1995).

El rol de la vía STAT en la producción de caseína se muestra en la fig. 6-22. Aquí, la hormona prolactina se une al dominio extracelular de los receptores de prolactina provocando la dimerización de éstos. Una proteína cinasa JAK está unida a cada uno de los receptores (en sus respectivas regiones citoplasmáticas), y estas proteínas JAK ahora se reúnen, donde ellas fosforilan a los receptores en varios sitios. Los receptores ahora se encuentran activados y tienen su propia actividad de proteína cinasa. Por lo tanto, las proteínas JAK transforman un receptor en un receptor de tirosina cinasa.

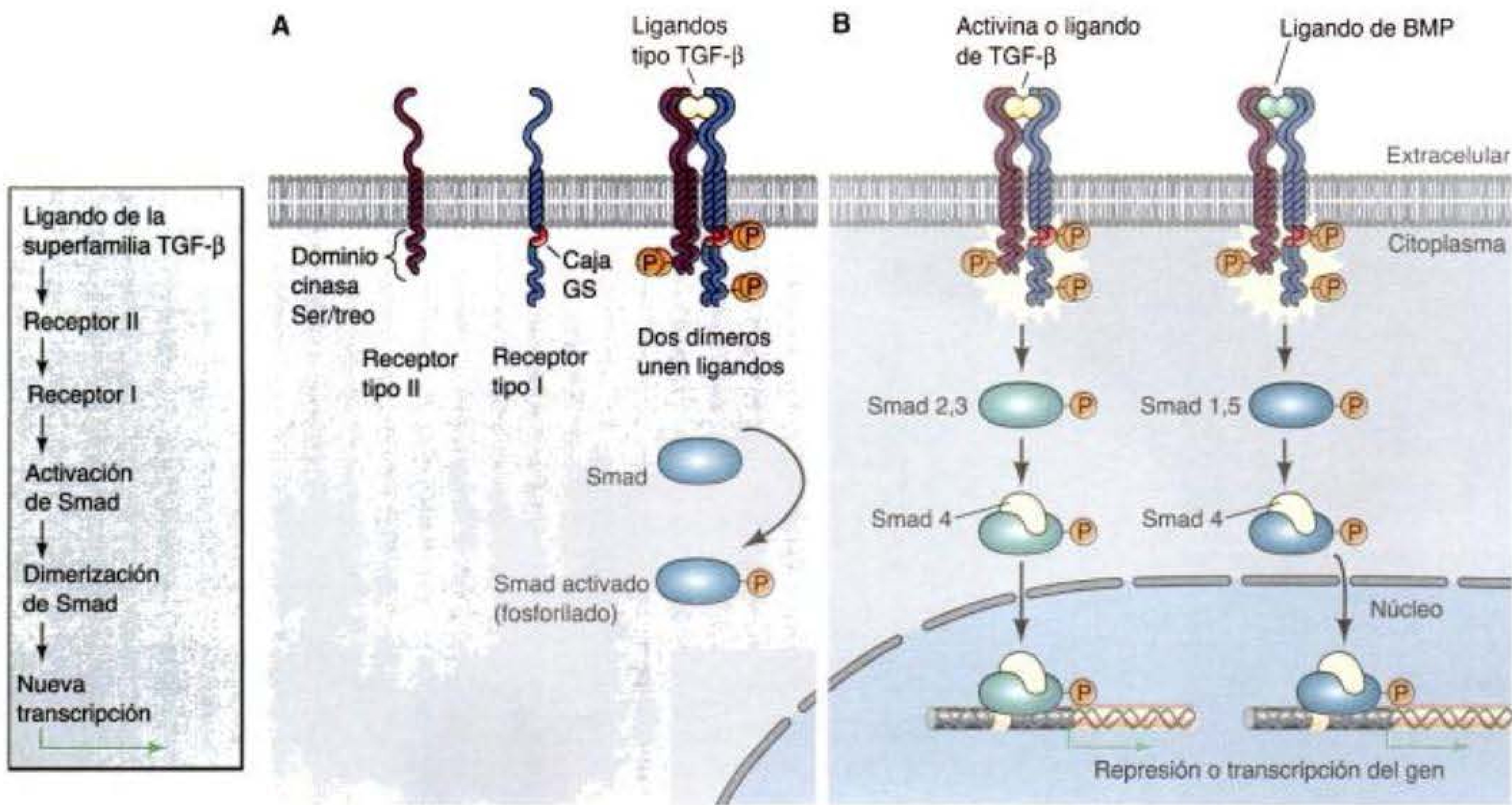


Fig. 6-21. La vía de Smad activada por los ligandos de la superfamilia TGF-β. **A.** Un complejo de activación es formado mediante la unión del ligando por los receptores tipo I y tipo II. Esto le permite al receptor tipo II fosforilar al receptor tipo I sobre residuos de serina o treonina específicos (de la "caja GS"). La proteína del receptor tipo I fosforilada ahora está en condiciones de fosforilar a las proteínas Smad. **B.** Aquellos receptores que unen proteínas de la familia TGF-β o miembros de la familia de activina fosforilan a las Smads 2 y 3. Aquellos receptores que unen a las proteínas de la familia BMP fosforilan a las Smads 1 y 5. Estas Smads pueden formar complejos con la Smad 4 para dar origen a factores de transcripción activos. Sobre la izquierda se muestra una versión simplificada de la vía.

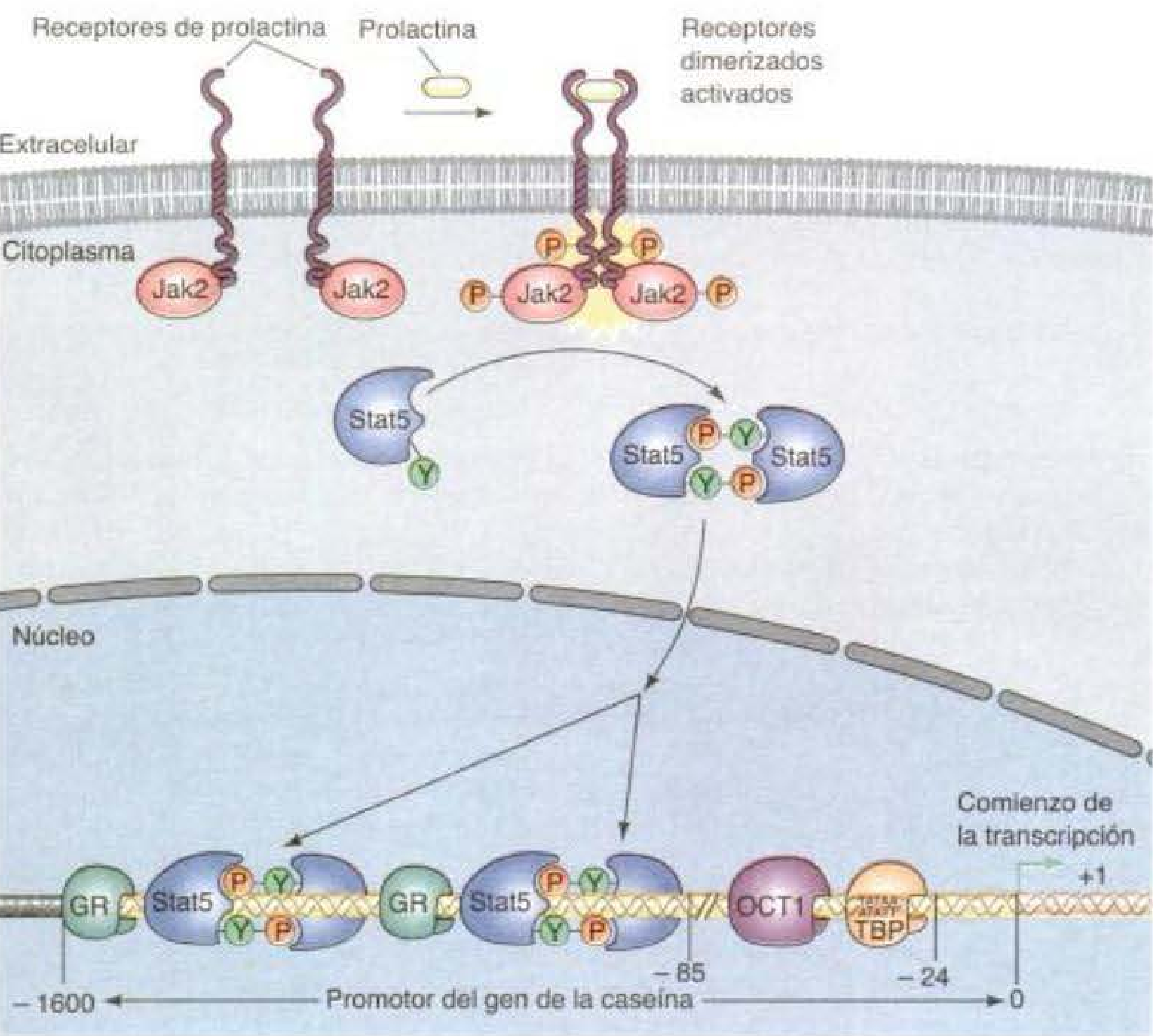


Fig. 6-22. Una vía de STAT: la vía de activación del gen de la caseína activado por la prolactina. El gen de la caseína es activado durante la última fase (lactogénica) del desarrollo de la glándula mamaria, y su señal es la secreción de la hormona prolactina a partir de la glándula hipófisis. La prolactina causa la dimerización de los receptores de prolactina en las células epiteliales de los conductos mamarios. Una proteína JAK específica (Jak2) está "enganchada" al dominio citoplasmático de estos receptores. Cuando los receptores unen prolactina y se dimerizan, las proteínas JAK se fosforilan entre sí y a los receptores dimerizados, activando la actividad cinasa inactiva de los receptores. Los receptores activados agregan un grupo fosfato a un residuo tirosina (Y) de una proteína STAT específica, en este caso Stat 5. Esto le permite a la Stat5 dimerizarse, translocarse en el núcleo, y unirse a regiones particulares del DNA. En combinación con otros factores de transcripción (que presumiblemente han estado esperando su llegada), la proteína Stat 5 activa la transcripción del gen de la caseína. GR es el receptor de glucocorticoides, OCT1 es un factor de transcripción general, y TBP es una proteína de unión a TATA (véase cap. 5) responsable de la unión de la RNA polimerasa. Un diagrama simplificado se muestra sobre la derecha. (Para detalles, véase Groner y Gouilleux 1995.)

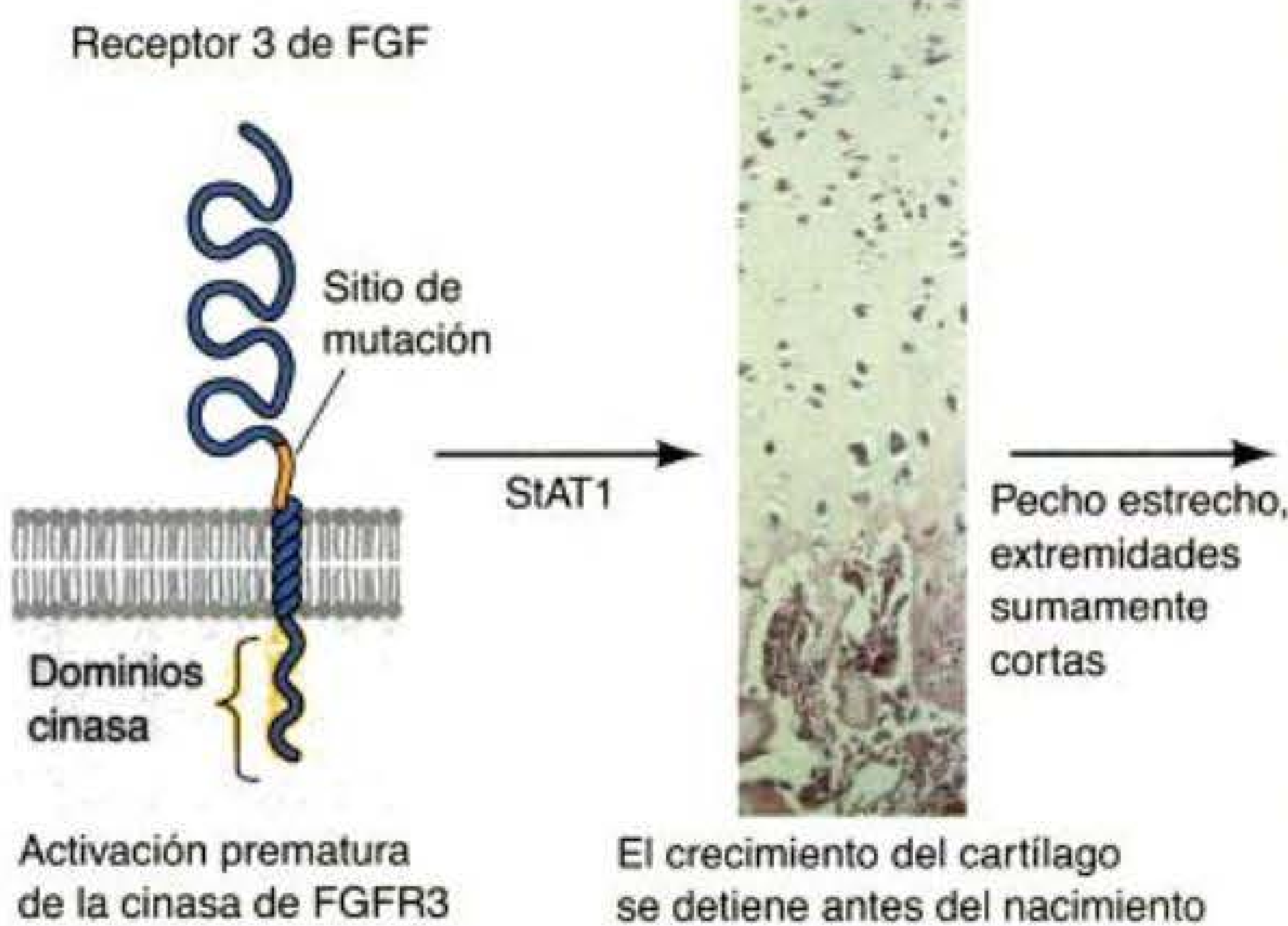


Fig. 6-23. Una mutación en el gen para FGFR3 es la responsable de la activación constitutiva prematura de la vía STAT y de la producción de la proteína fosforilada Stat1. Este factor de transcripción activa a genes que provocan la detención prematura de la división celular del condrocito. Como consecuencia se produce un crecimiento óseo inapropiado o fallado que da como resultado la muerte del recién nacido, debido a que su caja torácica no puede expandirse para producir la respiración. (De Gilbert-Barness y Opitz 1996.)

Los receptores activados ahora pueden fosforilar STAT inactivas específicas y hacer que ellas se dimericen. Estos dímeros son la forma activa de los factores de transcripción STAT, y son translocados hacia el núcleo, en donde se unirán a regiones específicas del DNA. En este caso, ellos se unen a elementos del promotor corriente arriba del gen de la caseína, permitiendo que éste sea transcripto.

La vía STAT es muy importante en la regulación del crecimiento óseo fetal humano. Las mutaciones que activan prematuramente a la vía STAT han sido involucradas en algunas formas severas de enanismo, como en el caso de la **displasia tanatofórica** letal, en la cual las placas de crecimiento de las costillas y de los huesos de las extremidades fracasan en proliferar. Los recién nacidos con extremidades cortas mueren debido a que sus costillas no pueden soportar la respiración. La lesión genética responsable está en el gen que codifica el receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3) (fig. 6-23; Rousseau y col. 1994; Shiang y col. 1994). Esta proteína es expresada en las células precursoras de cartílago –conocidas como **condrocitos**– en las placas de crecimiento de los huesos largos. Normalmente, la proteína FGFR3 (un receptor de tirosina cinasa) es activada por un factor de crecimiento fibroblástico, y esto le da la señal al condrocito para detener su división y comenzar a diferenciarse en cartílago. Esta señal es mediada por la proteína StAT1, que es fosforilada por FGFR3 activado y luego translocada hacia el núcleo. Dentro del núcleo, StAT1 activa a los genes que codifican un inhibidor del ciclo celular, la proteína p21 (Su y col. 1997). Las mutaciones causan enanismo tanatofórico resultando en un fenotipo de ganancia de función, en el cual FGFR3 mutante es constitutivamente activo, esto es, sin la necesidad de ser activado por un FGF (Deng y col. 1996; Webster y Donoghue 1996). Esto lleva al condrocito a detener la proliferación poco después de que se ha formado, y el hueso no puede crecer. Las mutaciones que activan prematuramente a FGFR3 en un grado menor producen enanismo acondroplásico (extremidades cortas), el más frecuente de los síndromes dominantes humanos.

SITIO WEB 6.6 **Mutaciones de FGFR (FGFR mutations).** Las mutaciones del receptor de FGF humano han sido asociadas con varios síndromes de malformaciones esqueléticas, incluidos los síndromes en los cuales falla el crecimiento o la diferenciación del cartílago del cráneo, del cartílago costal, o del cartílago de las extremidades.

La vía de Wnt

Los miembros de factores paracrinos de la familia Wnt interactúan con receptores de transmembrana de las proteínas de la familia **Frizzled** (frito). En la mayoría de los casos, la unión de Wnt por una proteína Frizzled lleva a que esta proteína active a la proteína Disheveled (despeinado). Una vez que la proteína Disheveled es activada, ésta inhibe la actividad de la enzima cinasa-3 glucógeno sintetasa (GSK-3, del inglés: *glycogen synthase Kinase-3*). Si GSK-3 fuera activo, impediría la disociación de la proteína b-catenina de la proteína APC, que tiene como blanco a la b-catenina para su degradación. Sin embargo, cuando se da la señal de Wnt y GSK-3 es inhibida, la b-catenina puede disociarse de la proteína APC e ingresar al núcleo. Una vez dentro del núcleo, puede formar un heterodímero con una proteína LEF o TCF que unen DNA, transformándose en un factor de transcripción. Este complejo se une y activa a los genes de respuesta a Wnt (fig. 6-24A; Behrens y col. 1996; Cadigan y Nusse 1997).

Este modelo es indudablemente una simplificación excesiva, debido a que distintas células usan esta vía en diferentes sentidos (véase McEwen y Peifer 2001). Por otra parte, estos componentes pueden tener más de una función en la célula. Además de ser parte de la cascada de transducción de la señal de Wnt, GSK-3 es también una enzima que regula el metabolismo del glucógeno. La proteína b-catenina fue reconocida como parte de un complejo de adhesión celular sobre la superficie celular antes de conocerse que era un factor de transcripción. La proteína APC también funciona como supresora de tumores en adultos. La transformación de las células

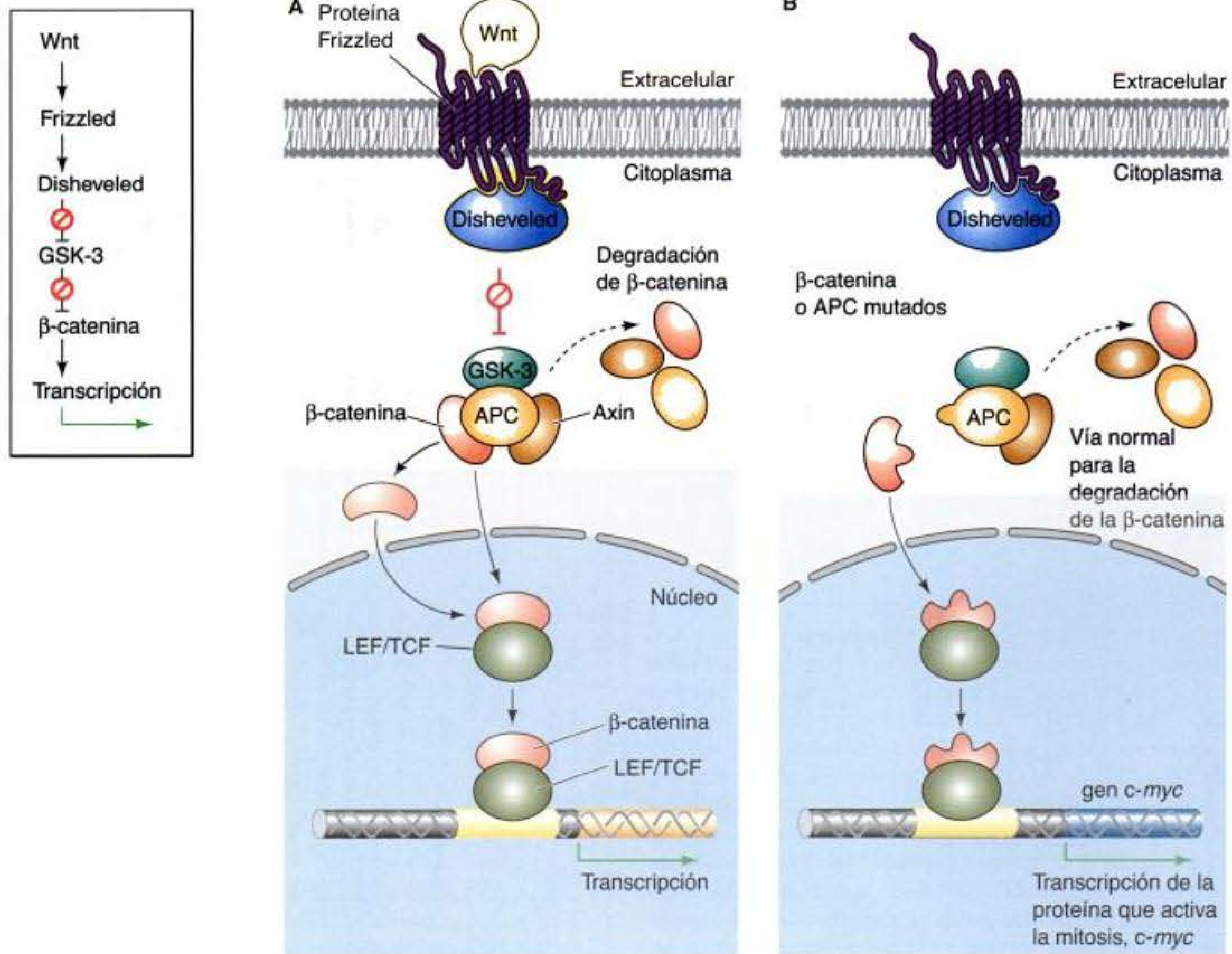


Fig. 6-24. La vía de transducción de la señal de Wnt. **A.** La proteína Wnt se une a su receptor, un miembro de la familia de las proteínas Frizzled. A continuación la proteína Frizzled activa a Disheveled, permitiéndole a éste convertirse en un inhibidor de la cinasa 3 glucógeno sintetasa (GSK-3). Si GSK-3 fuera activa, impediría la disociación de la β-catenina de la proteína APC. De este modo, mediante la inhibición de GSK-3, la señal de Wnt libera a la β-catenina para que pueda asociarse con la proteína LEF o TCF transformándose en un factor de transcripción activo. **B.** En las células del adulto, si el gen para APC o para β-catenina está mutado de modo tal que las dos proteínas no se puedan unir entre sí, se le permite a la β-catenina ingresar constitutivamente al núcleo. Esto genera que la β-catenina active a ciertos genes de la división celular y dé comienzo a la formación de tumores. (B, según Pennisi 1998.)

epiteliales normales del colon en un colon con cáncer se piensa que se produce cuando el gen APC es mutado y no puede mantener mucho tiempo a la proteína b-catenina fuera del núcleo (fig. 6-24B; Korinek y col. 1997; He y col. 1998). Una vez en el núcleo, la β-catenina puede unirse a otro factor de transcripción y activar genes para la división celular. Un principio fácilmente visto en la vía de Wnt (y que es también evidente en la vía de Hedgehog) es que la *activación es a menudo llevada a cabo mediante la inhibición de un inhibidor.* Por lo tanto, la proteína GSK-3 es un inhibidor que es a sí mismo reprimido por la señal de Wnt.

Además de enviar señales al núcleo, Wnt puede también afectar al citoesqueleto microtubular y de actina. Aquí, Wnt activa vías, "no canónicas", alternativas. Por ejemplo, cuando Wnt activa a Disheveled, la proteína Disheveled puede interactuar con la GTPasa Rho. Esta GTPasa puede activar las cinasas que fosforilan a proteínas del citoesqueleto y como consecuencia alteran la forma de la célula, la polaridad celular (donde difieren las partes superior e inferior) y la motilidad (Shulman y col. 1998; Winter y col. 2001). Una tercera vía de Wnt se separa tempranamente de Disheveled. Aquí, la proteína receptora Frizzled activa a una fosfolipasa que sintetiza un componente que libera iones de calcio del retículo endoplasmático.

La vía de Hedgehog

Los miembros de la familia de la proteína Hedgehog funcionan como factores paracrinos mediante la unión a un receptor denominado Patched (remendado). Sin embargo, la proteína Patched, no es un transductor de señal. En su lugar, se une a un transductor de señal, la proteína Smoothened (alisada o suavisada). La proteína Patched impide el funcionamiento de smoothened. Ante la ausencia de unión de Hedgehog a Patched, Smoothened se encuentra inactiva, y la proteína Cubitus interruptus (Ci)

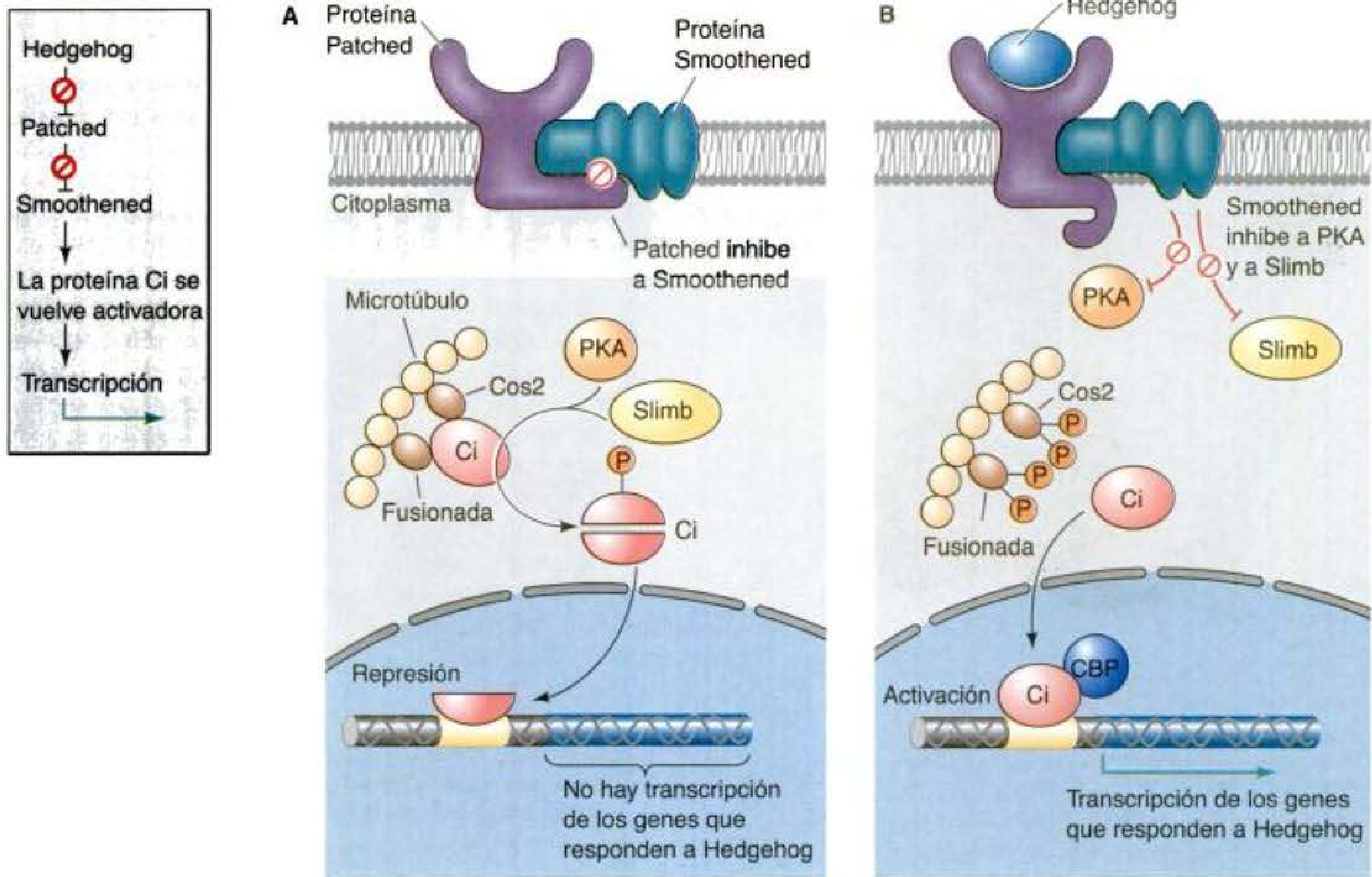


Fig. 6-25. La vía de transducción de la señal de Hedgehog. La proteína Patched en la membrana celular es un inhibidor de la proteína Smoothened. **A.** Ante la ausencia de la proteína Hedgehog uniéndose a Patched, la proteína Ci es unida a los microtúbulos (mediante las proteínas Cos2 y Fusionada -Fused-). Esta unión les permite a las proteínas PKA y Slimb segmentar a Ci en un represor transcripcional que bloquea la transcripción de genes específicos. **B.** Cuando Hedgehog se une a Patched, cambia su conformación, liberando la inhibición de la proteína Smoothened. Smoothened libera a Ci desde los microtúbulos (probablemente mediante el agregado de más fosfatos a las proteínas Cos2 y Fusionada) e inactiva a las proteínas de segmentación PKA y Slimb. La proteína Ci ingresa al núcleo, se une a una proteína CBP y actúa como un activador transcripcional de genes específicos. (Según Johnson y Scott 1998.)

está unida a los microtúbulos de la célula que responde. Mientras se encuentra en los microtúbulos, es partida en trozos de modo tal que una parte de ésta ingresa al núcleo y actúa como un represor transcripcional. Esta porción de la proteína Ci se une a los promotores y a los potenciadores de genes específicos y actúa como un inhibidor de la transcripción. Cuando Hedgehog se une a Patched, la forma de la proteína Patched es alterada de modo tal que no inhibe más a Smoothened. Smoothened actúa (probablemente por fosforilación) liberando la proteína Ci del microtúbulo y evitando que sea partida en trozos. La proteína Ci intacta está ahora en condiciones de ingresar al núcleo, en donde actúa como un activador transcripcional de los mismos genes que ella solía reprimir (fig. 6-25; Aza-Blanc y col. 1997).

La vía Hedgehog es sumamente importante en la diferenciación neural y de las extremidades de los vertebrados. Cuando se generaron ratones homocigotas para un alelo mutante de Sonic hedgehog, tenían anomalías principales de los miembros así como **ciclopía**, un único ojo en el centro de la frente (Chiang y col. 1996). Las proteínas Gli de vertebrados son las homólogas a la proteína Ci de Drosophila. Varios truncamientos del gen GLI3 de seres humanos producen una proteína no funcional que da origen a la cefalopolisindactilia de Grieg, una condición que se caracteriza por prominencia frontal y dígitos extras. Un truncamiento menos severo retiene el dominio de unión al DNA de la proteína GLI3 pero elimina la región activadora. Esta proteína GLI3 mutante puede actuar únicamente como represor. Esta proteína es encontrada en los niños con el síndrome de Pallister-Hall, un síndrome mucho más grave (en efecto, es letal poco después del nacimiento) involucrando no solo dígitos extras, sino además un pobre desarrollo de la glándula hipófisis, hipotálamo, ano y riñones (véase Shin y col. 1999).

Mientras que las mutaciones que inactivan a la vía de Hedgehog pueden provocar malformaciones, las mutaciones que activan ectópicamente a la vía pueden generar cáncer. Si la proteína Patched está mutada en los tejidos somáticos de modo tal que no puede inhibir a Smoothened, puede causar tumores de células de la capa basal de la epidermis (carcinomas de células basales). Las mutaciones hereditarias del gen *patched* causan síndrome de nevo celular, una condición autosómica dominante poco común caracterizada por anomalías del desarrollo (dedos fusionados, anomalías facial y costales) y múltiples tumores malignos como los carcinomas de célula basal (Hahn y col. 1996; Johnson y col. 1996).



Fig. 6-26. Cabeza de un cordero ciclope nacido de una oveja que había comido *Veratrum californicum* durante su embarazo temprano. Los hemisferios cerebrales fusionados, forman solamente un ojo central y no generan glándula hipófisis. El alcaloide jervine producido por estas plantas inhibe la síntesis de colesterol, que es necesaria para la producción y recepción de Hedgehog. (Fotografía cortesía de L. James y del USDA Poisonous Plant Laboratory.)

Una característica sorprendente de la vía de transducción de la señal de Hedgehog es la importancia del colesterol. En primer lugar, el colesterol es crítico para la segmentación catalítica de la proteína Sonic hedgehog. Únicamente la porción aminoterminal de la proteína es funcional y es secretada. El colesterol además se une al N-terminal activo de la proteína Sonic hedgehog y le permite a este factor paracrino difundirse cerca de unos pocos cientos de μm (cerca de 30 diámetros celulares en la extremidad del ratón). Sin esta modificación del colesterol, la difusión es severamente obstaculizada (Lewis y col. 2001). En segundo lugar, la proteína Patched que une a Sonic hedgehog también necesita colesterol para poder funcionar. Algunos síndromes de ciclopía humanos son causados por mutaciones en los genes que codifican Sonic hedgehog o la enzima que sintetiza colesterol (Kelley y col. 1996; Roessler y col. 1996). Además, ciertos químicos que inducen ciclopía* lo hacen al interferir con las enzimas de biosíntesis de colesterol (fig. 6-26; Beachy y col. 1997; Cooper y col. 1998).

> VADE MECUM[2] **Ciclopía inducida en el pez cebra (Cyclopia induced in zebrafish).** El alcohol puede actuar como teratógeno y puede inducir ciclopía en los embriones del pez cebra. **[Hacer clic sobre Zebrafish]**

* Los factores ambientales que causan las anomalías del desarrollo son denominados **teratógenos**, y serán discutidos con mayor precisión en los capítulos 21 y 22. Jervine y ciclopamine son dos teratógenos conocidos que causan ciclopía en vertebrados. Ambas sustancias son halladas en la planta *Veratrum californicum* (Keeler y Binns 1968) y ambos bloquean la síntesis del colesterol.

Vías o caminos de la muerte celular

"Ser o no ser, ésa es la pregunta." Mientras que nosotros estamos situados en decisiones de vida-o-muerte, esta dicotomía existencial es excepcionalmente dura para las células embrionarias. La **muerte celular programada**, o **apoptosis**,* es una parte normal del desarrollo (véase Baehrecke 2002). En el nematodo *C. elegans*, en el que se puede contar el número de células, según el patrón de desarrollo normal mueren exactamente 131 células. Todas las células de este nematodo están "programadas" para morir a menos que se les diga activamente no experimentar apoptosis. En los seres humanos, tanto como 1.011 células mueren en cada adulto cada día y son reemplazadas por otras células. (¡De hecho, la masa de células que perdemos cada año durante la muerte celular normal es cercana a nuestro peso corporal total!) Dentro del útero, estamos produciendo y destruyendo células constantemente, y generamos un número cerca de tres veces mayor de las neuronas que finalmente tenemos al momento del nacimiento. Lewis Thomas (1992) acertadamente observó:

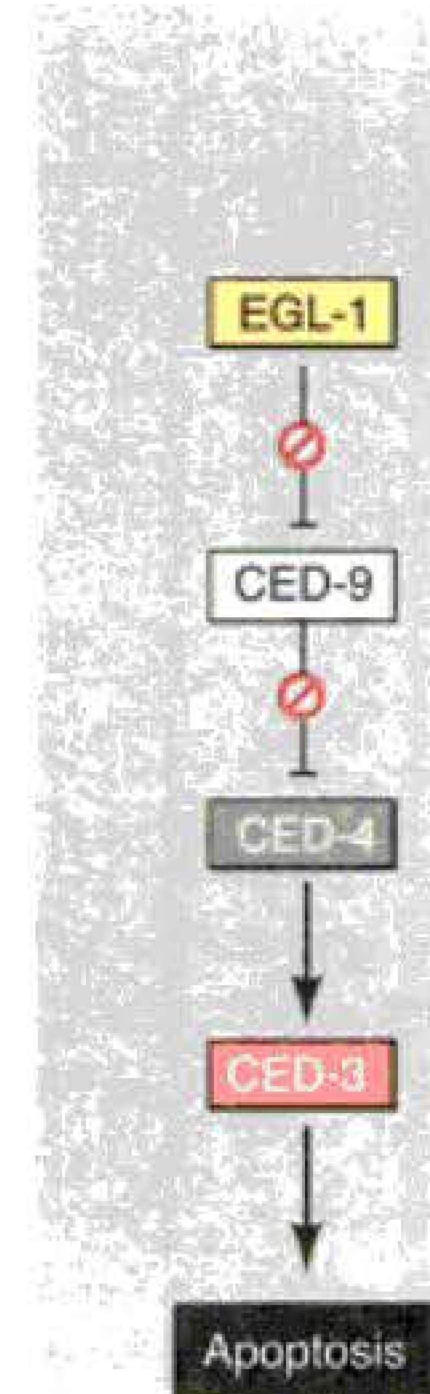
> *Para el momento en el que nací, más de mí había muerto que sobrevivido. No es de extrañar que no pueda recordar; durante aquel tiempo pasé por un cerebro tras otro durante nueve meses, concibiendo finalmente un modelo que podría ser humano, equipado para el lenguaje.*

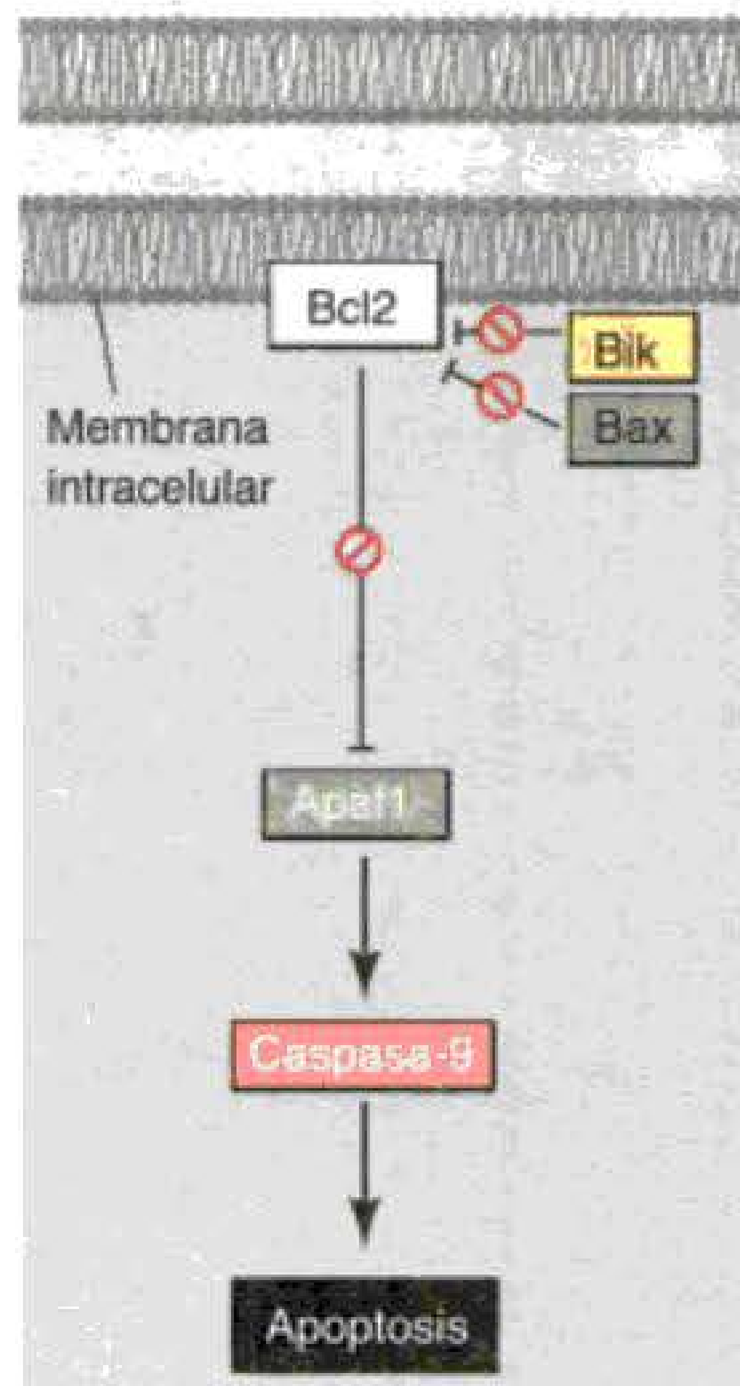
La apoptosis no es solamente necesaria para el espaciamiento y orientación de las neuronas, sino además para generar el espacio del oído medio, la apertura vaginal y los espacios entre nuestros dedos de la mano y del pie (Saunders y Fallon 1966; Roberts y Miller 1998; Rodríguez y col. 1997). La apoptosis recorta las estructuras innecesarias (colas de las ranas, tejido mamario masculino), controla el número de células en tejidos específicos (neuronas en vertebrados y moscas), y esculpe órganos complejos (paladar, retina, dígitos y corazón).

Distintos tejidos utilizan diferentes señales para la apoptosis. Una de las señales utilizada con frecuencia en vertebrados es la proteína morfogenética del hueso 4 (BMP4). Algunos tejidos, como el tejido conectivo, responden a BMP4 mediante la diferenciación en hueso. Otros, como en el caso del ectodermo de la gástrula de rana, responden a BMP4 mediante la diferenciación a piel. Aun otros, como las células de la cresta neural y los primordios de los dientes, responden degradando su DNA y muriendo. Por ejemplo, durante el desarrollo del diente son secretados por el nudo del esmalte numerosos factores de crecimiento y diferenciación. Luego del crecimiento de la cúspide o capuchón del diente, el nudo del esmalte sintetiza BMP4 y se cierra por apoptosis (véase cap. 13; Vaahtokari y col. 1996b).

En otros tejidos, las células están "programadas" para morir, y se mantendrán vivas únicamente si está presente

* El término *apoptosis* (ambas "p" son pronunciadas) proviene de la palabra griega para el proceso natural de las hojas que caen de los árboles o de los pétalos que caen de las flores. La apoptosis es un proceso activo que puede estar sujeto a una selección evolutiva. Un segundo tipo de muerte celular, la *necrosis*, es una muerte patológica causada por factores externos como la inflamación o el daño tóxico.





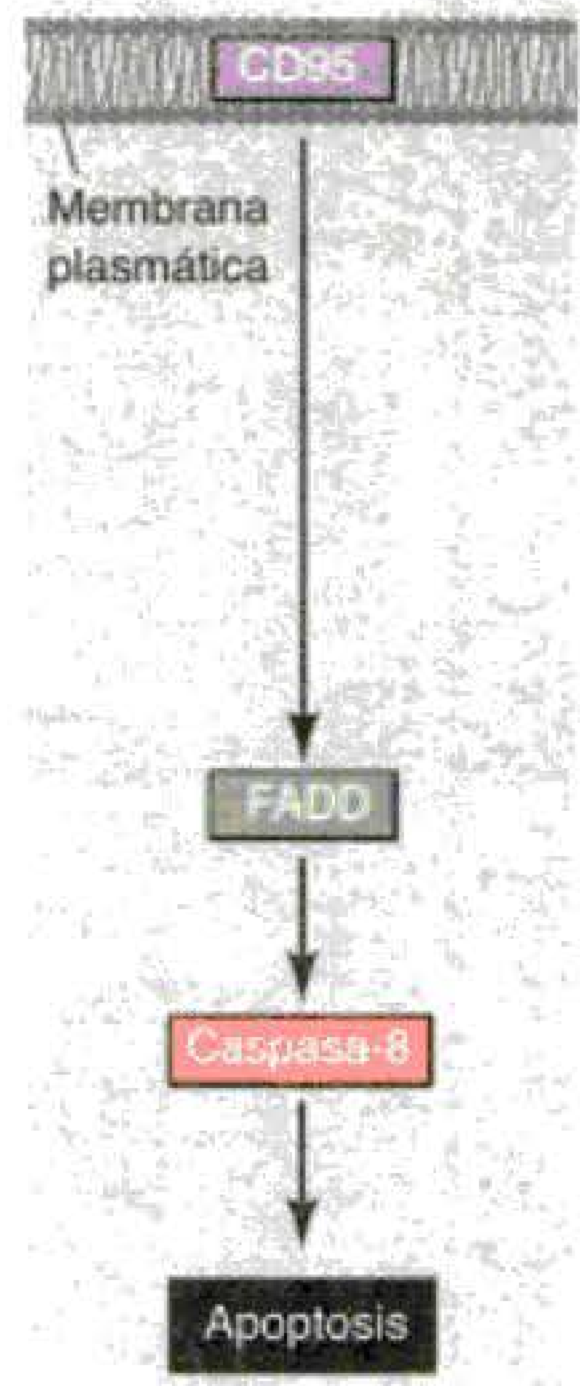


Fig. 6-27. Vías o caminos de apoptosis en nematodos y mamíferos. **A.** En *C. elegans*, la proteína CED-4 es un factor activador de proteasa que puede activar a la proteasa CED-3. La proteasa CED-3 inicia el evento de destrucción celular. CED-9 puede inhibir a CED-4 (y CED-9 puede ser inhibido corriente arriba por EGL-1). **B.** En mamíferos, existe una vía similar, y parece funcionar de un modo semejante. En este esquema hipotético para la regulación de la apoptosis en las neuronas de mamífero, BclXL (un miembro de la familia Bcl2) se une a Apaf1 y evita que éste pueda activar al precursor de la caspasa-9. La señal para la apoptosis le permite a otra proteína (aquí, Bik) inhibir la unión de Apaf1 a BclXL. Ahora, Apaf-1 es capaz de unirse al precursor de la caspasa-9 y segmentarlo. Ahora la caspasa-9 se dimeriza y activa a la caspasa-3, que comienza la apoptosis. **C.** En los mamíferos hay otras vías de apoptosis, como una iniciada por la proteína CD95 en la membrana celular de los linfocitos. Son utilizados los mismos colores para representar las proteínas homólogas. (Según Adams y Cory 1998.)

algún factor de crecimiento o de diferenciación para "rescatarlas". Esto sucede durante el desarrollo de los glóbulos rojos de mamíferos. Los precursores de los glóbulos rojos en el hígado del ratón necesitan la hormona eritropoyetina para poder sobrevivir. Si no la reciben, experimentan apoptosis. El receptor de eritropoyetina funciona a través de la vía JAK-STAT, activando al factor de transcripción Stat5. En este sentido, la cantidad de eritropoyetina presente puede determinar cuántos glóbulos rojos entrarán en circulación.

Una de las vías para la apoptosis fue definida en gran medida a través de los estudios genéticos de *C. elegans*. En efecto, la importancia de esta vía fue reconocida por la concesión de un premio Nobel a Sydney Brenner, Bob Horvitz y Jonathan Sulston en 2002. Se encontró que las proteínas codificadas por los genes ced-3 y ced-4 eran esenciales para la apoptosis, pero en las células que no experimentaban apoptosis, estos genes estaban apagados por el producto del gen ced-9 (fig. 6-27; Hengartner y col. 1992). La proteína CED-4 es un factor activador de proteasa que activa a CED-3, una proteína que inicia la destrucción de la célula. La proteína CED-9 puede unir e inactivar a CED-4. Las mutaciones que inactivan al gen ced-9 provocan en numerosas células que normalmente sobrevivirían la activación de sus genes ced-3 y ced-4 y su muerte, conduciendo a la muerte del embrión en su totalidad. Por el contrario, las mutaciones de ganancia de función de ced-9 llevan a que la proteína CED-9 sea producida en las células que normalmente morirían, resultando en su supervivencia. Por lo tanto, el gen ced-9 parece ser un interruptor binario que regula la opción entre la vida y la muerte a nivel celular. Es posible que cada célula en el embrión de nematodo sea llevada a morir, y aquellas células que sobreviven sean rescatadas mediante la activación del gen ced-9.

Las proteínas CED-3 y CED-4 forman el centro de la vía de la apoptosis que es común para todos los animales estudiados. El disparo para la apoptosis puede ser una señal de desarrollo como una molécula específica (como BMP4 o glucocorticoides) o la pérdida de la adhesión a la matriz. Cada uno de los tipos de señal puede activar a las proteínas CED-3 o CED-4 o inactivar a las moléculas CED-9. En mamíferos, las homólogas de la proteína CED-9 son miembros de los genes de la **familia Bcl-2**. Esta familia incluye a los genes *Bcl-2, Bcl-X* y semejantes. Las semejanzas funcionales son tan fuertes que si un gen *Bcl-2* humano activo es colocado en un embrión de *C. elegans*, éste evita que se produzca normalmente la muerte celular en el embrión de nematodo (Vaux y col. 1992). Uno de los promotores reconocidos por el factor de transcripción Mitf en melanocitos es el promotor para *Bcl-2*. Mediante la activación del gen *Bcl-2*, Mitf evita la muerte celular apoptótica de estas células pigmentadas (McGill y col. 2002; véase fig. 6-16B). En el desarrollo de los glóbulos rojos de vertebrados, el factor de transcripción Stat5 activado por eritropoyetina funciona mediante la unión al promotor del gen *Bcl-X*, en donde activa la síntesis de la proteína anti-apoptosis (Socolovsky y col. 1999).

El homólogo de mamíferos de CED-4 es denominado **Apaf1** (factor activador de proteasa apoptótica 1; del inglés: ***apoptotic protease activating factor 1***)*, y participa en la activación citocromo *c*-dependiente de las

* Hay alguna evidencia (véase Barinaga 1998a,b; Saudou y col. 1998) de que la activación de la vía de la apoptosis en las neuronas del adulto puede ser responsable de la patología de la enfermedad de Alzheimer y del derrame cerebral. La fragmentación del DNA es uno de los principales modos mediante el cual es reconocida la apoptosis, y es vista en regiones del cerebro afectadas por estas enfermedades. La fragmentación del DNA en trozos de tamaños específicos (protegidos y sostenidos por los nucleosomas) puede ser causada por la digestión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) por la caspasa-3 (Lazebnik y col. 1994). Las PARP reconocen y reparan el DNA roto. Para más vías y otras que llevan a la apoptosis, véase Green 1998.

A *caspasa-9*+/+ (Normal)



B *caspasa-9*−/− *(Knockout)*



C Normal



D *Knockout*

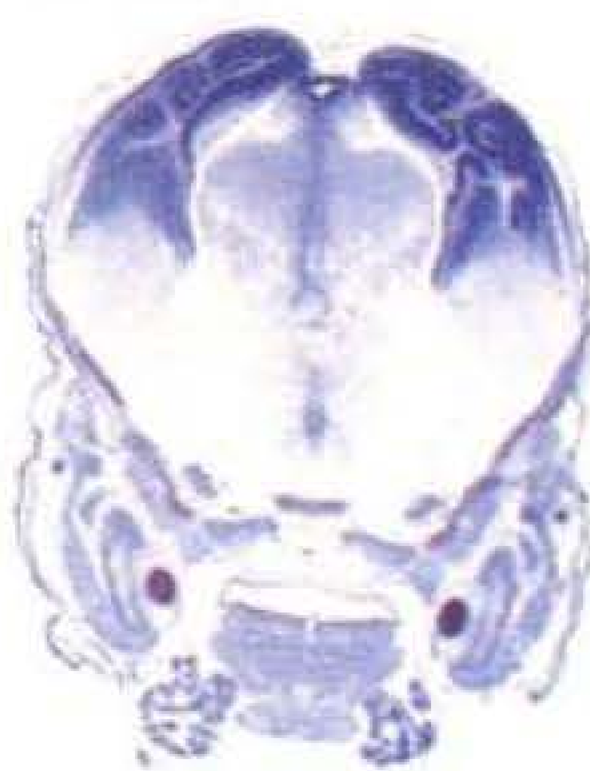


Fig. 6-28. Perturbación del desarrollo normal del cerebro por bloqueo de la apoptosis. En los ratones en los que los genes para la caspasa-9 han sido noqueados (*knockout*), no se produce la apoptosis normal, y resulta obvia la proliferación excesiva de las neuronas del cerebro. **A.** Embrión de ratón tipo salvaje de 16 días. **B.** Ratón knockout para *caspasa-9* de la misma edad. El cerebro aumentado de tamaño sobresale por delante de la cara, y las extremidades tienen todavía las membranas interdigitales. **C,D.** Este efecto es confirmado mediante secciones transversales a través del cerebro anterior en el día 13,5. El *knockout* muestra el engrosamiento de las paredes ventriculares y los ventrículos casi obliterados. (De Kuida y col. 1998.)

CED-3 homólogas de mamíferos, las proteasas **caspasa-9** y **caspasa-3** (Shaham y Horvitz 1996; Cecconi y col. 1998; Yoshida y col. 1998). La activación de las caspasas causa la autodigestión de la célula. Las caspasas son proteasas fuertes que digieren la célula desde adentro, segmentando proteínas celulares y fragmentando el DNA.

Mientras que los nematodos carentes de apoptosis deficientes para CED-4 son viables (a pesar de tener un 15% más de células que los gusanos tipo salvaje), los ratones con mutaciones de pérdida de función para la *caspasa-3* o para la *caspasa-9* mueren cerca del nacimiento debido a un masivo crecimiento celular excesivo en el sistema nervioso (fig. 6-28; Kuida y col. 1996, 1998; Jacobson y col. 1997). Los ratones homocigotas para la inactivación dirigida de *Apaf1* tienen anomalías craneofaciales graves similares, crecimiento excesivo del cerebro y membranas entre los dedos del pie (membranas interdigitales).

En mamíferos, hay más de una vía de apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis de los linfocitos no es afectada por la eliminación de *Apaf1* o de la *caspasa-9*, y funciona por una vía separada iniciada por la proteína CD95 (véase fig. 6-27C). Diferentes caspasas pueden estar funcionando en distintos tipos celulares para mediar las señales apoptóticas (Hakem y col. 1998; Kuida y col. 1998).

SITIO WEB 6-7 **El uso de la apoptosis (The uses of apoptosis).** La apoptosis es utilizada para numerosos procesos durante el desarrollo. Este sitio web explora la función de la apoptosis en fenómenos tales como el desarrollo de la célula germinal de *Drosophila* y de los ojos del pez ciego de las cuevas.

Señalización yuxtacrina

En las interacciones yuxtacrinas, las proteínas de las células inductoras interactúan con proteínas receptoras de células adyacentes que responden sin difundir desde la célula que la generó. Hay tres tipos de interacciones yuxtacrinas.

1. Una proteína sobre una membrana celular se une a su receptor situado sobre la membrana celular adyacente. Se verá este tipo de interacción yuxtacrina cuando se discuta la interacción entre la proteína Bride-of-sevenless y su receptor, Sevenless.
2. El receptor sobre una célula se une a su ligando sobre la matriz extracelular secretada por otra célula.
3. Una señal es transmitida directamente desde el citoplasma de una célula a través de pequeños conductos al citoplasma de una célula adyacente.

La vía Notch: ligandos y receptores yuxtapuestos

Mientras que la mayoría de los reguladores de inducción conocidos son proteínas difusibles, algunas proteínas inductoras se mantienen unidas a la superficie celular inductora. En una de estas vías, células expresando las proteínas **Delta, Jagged** (irregular o con picos) o **Serrate** (serrado) en sus membranas celulares activan a las células vecinas que contienen la proteína **Notch** (muesca) en su membrana celular. Notch se extiende a través de la membrana celular, y sobre su superficie externa contacta a las proteínas Delta, Jagged o Serrate que desde una célula adyacente se extienden hacia el exterior. Cuando Notch forma un complejo con estos ligandos, experimenta un cambio conformacional que le permite a parte de su dominio citoplasmático ser cortado por la proteasa presenilina-1. La porción fragmentada ingresa al núcleo y se une a un factor de transcripción de la familia CSL inactivo. Cuando el factor CSL se une a la proteína Notch, los factores de transcripción CSL activan a sus genes de interés (fig. 6-29; Lecourtois y Schweisguth 1998; Schroeder y col. 1998; Struhl y Adachi 1998). Se piensa que esta activación implica el reclutamiento de las acetiltransferasas de histonas (Wallberg y col. 2002).

Las proteínas Notch son receptores sumamente importantes en el sistema nervioso. En el sistema nervioso de vertebrados y de *Drosophila*, la unión de Delta a Notch le dice a la célula que recibe la señal no convertirse en neural (Chitnis y col. 1995; Wang y col. 1998). En

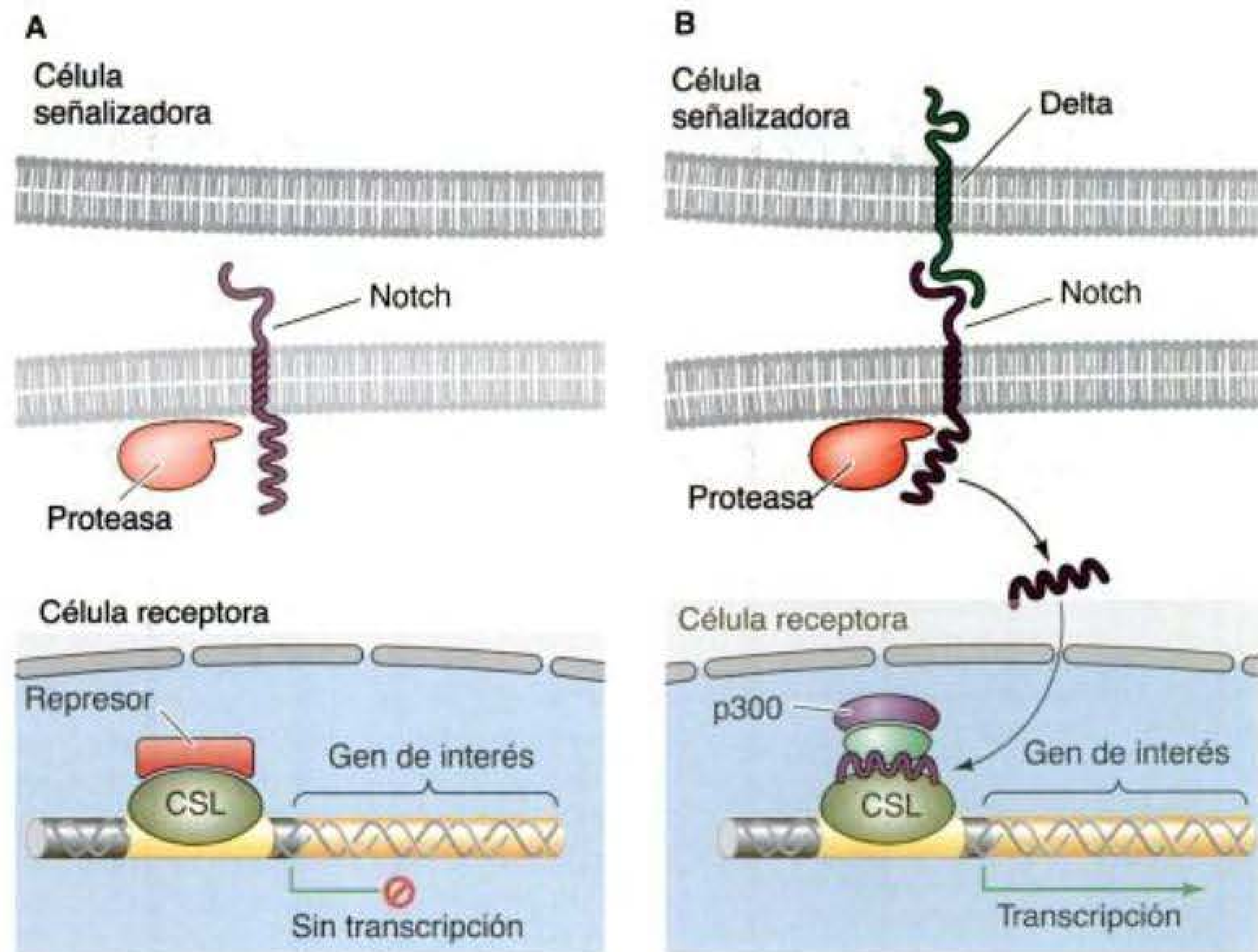


Fig. 6-29. Mecanismos de la actividad de Notch. **A.** Previo a la señalización de Notch, un factor de transcripción CSL (como el supresor de hairless –sin pelo– o CBF1) está sobre el potenciador de los genes regulados por Notch. CSL une a represores de la transcripción. **B.** Modelo para la activación de Notch. Un ligando (las proteínas Delta, Jagged, o Serrate) sobre una célula se une al dominio extracelular de la proteína Notch de una célula adyacente. Esta unión causa un cambio de forma en el dominio intracelular de Notch, que activa a una proteasa. La proteasa corta a Notch y le permite a la región intracelular de la proteína Notch ingresar al núcleo y unirse al factor de transcripción CSL. Esta región intracelular de Notch desplaza a las proteínas represoras y une a los activadores de la transcripción, incluyendo a la acetiltransferasa de histona p300. A continuación el CSL activado puede transcribir sus genes de interés (Según Koziol-Dube, comunicación personal.)

el ojo de vertebrados, la interacción entre Notch y sus ligandos parece regular qué células llegarán a ser neuronas ópticas y cuáles se convertirán en células de la glía (Dorsky y col. 1997; Wang y col. 1998). Las proteínas Notch son también importantes en el establecimiento del patrón de la vulva del nematodo (véase fig. 6-20). La VPC primaria (próxima a la célula ancla) es capaz de inhibir a sus vecinas de convertirse en células centrales de la vulva al señalizarlas a través de su homólogo de Notch, el receptor LIN-12. La señal LIN-12 bloquea la vía de la proteína cinasa iniciada por la señal LIN-3 (Berset y col. 2001).

SITIO WEB 6-8 **Mutaciones de Notch (Notch mutations).** Las mutaciones en las proteínas Notch en seres humanos pueden causar anomalías del sistema nervioso. Los seres humanos tienen más de un gen Notch y más de un ligando. Sus interacciones pueden ser críticas en el desarrollo neural. Además, la asociación de Notch con la proteasa presenilina sugiere que la alteración de la función de Notch podría llevar a la enfermedad de Alzheimer.

Información adicional y especulaciones

Interacciones célula-célula y azar en la determinación de los tipos celulares

El desarrollo de la vulva en *C. elegans* ofrece varios ejemplos de inducción a nivel celular. Ya se ha discutido la recepción de la señal tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) de LIN-3 por las células del grupo de equivalencia que pueden formar la vulva. Pero antes de producirse la inducción, hay una interacción temprana que forma la célula ancla. La formación de la célula ancla está mediada por el gen *lin-12*, homólogo del gen *Notch* de *C. elegans*. En los *C. elegans* hermafroditas tipo salvaje, dos células adyacentes, Z1.ppp y Z4.aaa, tienen el potencial para llegar a ser célula ancla. Ellas interactúan de un modo tal que provocan que una de ellas se convierta en célula ancla mientras que la otra llega a ser precursora de tejido uterino. En los mutantes de pérdida de función de *lin-12*, ambas células se convierten en células ancla, mientras que en las mutaciones de ganancia de función, ambas células llegan a ser precursores uterinos (Greenwald y col. 1983). Estudios utilizando mosaicos genéticos y ablaciones celulares han demostrado que esta decisión es tomada en el segundo estadio larval, y que el gen *lin-12* solamente es necesario para funcionar en aquellas células destinadas a convertirse en los precursores celulares uterinos. La célula ancla presuntiva no necesita a este gen.

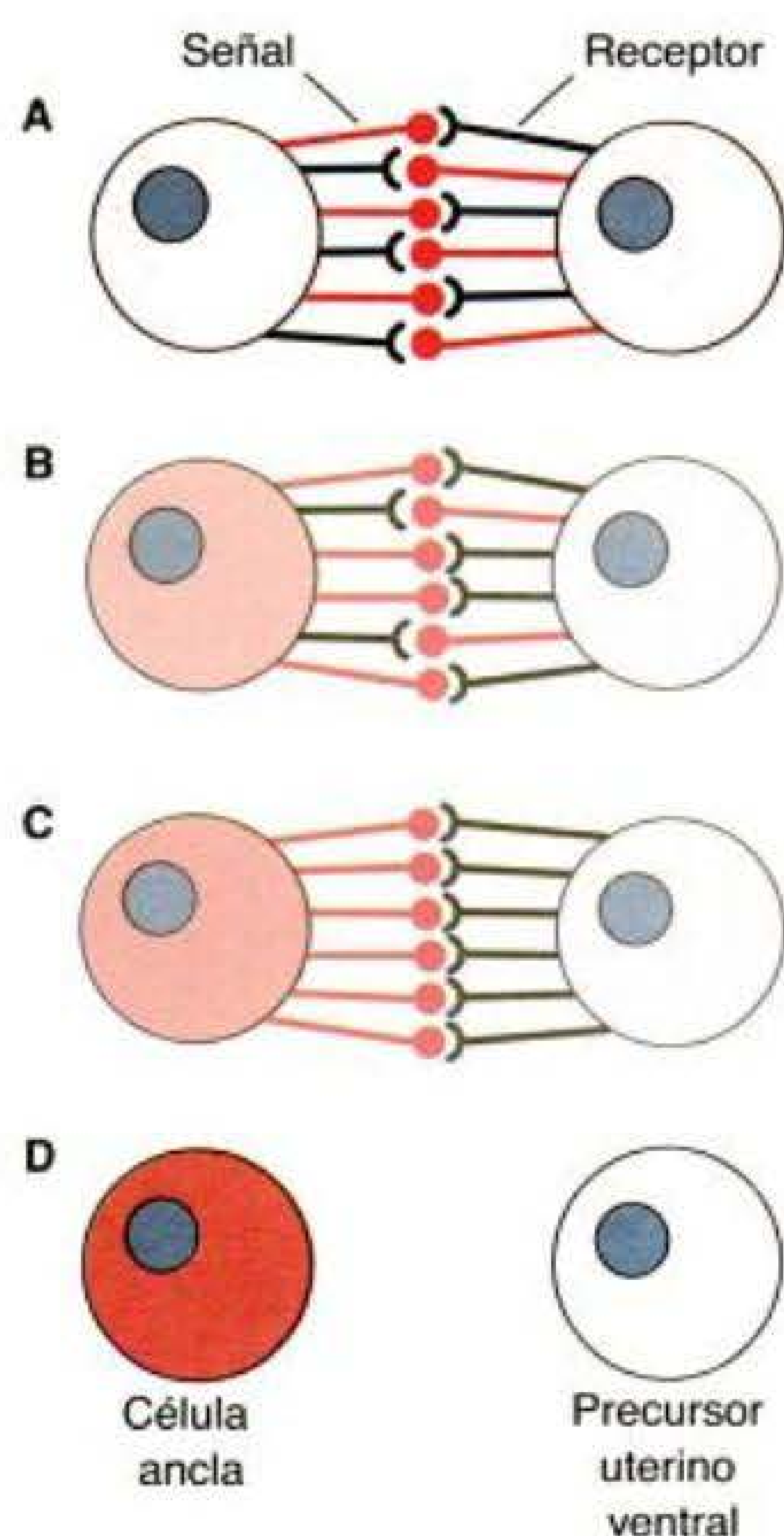


Fig. 6-30. Modelo para la generación de dos tipos celulares (célula ancla y precursor uterino ventral) a partir de dos células equivalentes (Z1.ppp y Z4.aaa) en *C. elegans.* **A.** Las células empiezan como equivalentes, produciendo cantidades fluctuantes de señal y receptor (flecha invertida). Se piensa que el gen lag-2 codifica la señal; se cree que el gen *lin-12* codifica el receptor. La recepción de la señal baja la producción de LAG-2 (Delta) y regula en más a LIN-12 (Notch). **B.** Un acontecimiento estocástico (por azar) provoca que una célula produzca más LAG-2 que la otra célula en algún tiempo crítico particular. Esto estimula una mayor producción de LIN-12 en las células vecinas. **C.** Esta diferencia es amplificada, debido a que la célula que produce más LIN-12 produce menos LAG-2. Finalmente, solo una célula está emitiendo la señal LAG-2, y la otra la está recibiendo. **D.** La célula señalizadora llegará a ser célula ancla; la célula receptora se convertirá en precursor uterino ventral. (Según Greenwald y Rubin 1992.)

Seydoux y Greenwald (1989) especulan que estas dos células originalmente sintetizan la señal para la diferenciación uterina (la proteína LAG-2, homóloga a la proteína Delta en *Drosophila*) y el receptor para esta molécula (la proteína LIN-12 homóloga de Notch) (fig. 6-30; Wilkinson y col. 1994). Durante un momento particular en el desarrollo larval, la célula que por azar, está secretando más LAG-2 genera en las células vecinas la interrupción en la producción de esta señal de diferenciación y el incremento de la producción de la proteína LIN-12. La célula que secreta LAG-2 llega a ser la célula ancla gonadal, mientras que la célula receptora de la señal a través de su proteína LIN-12 llega a ser la célula precursora uterina ventral. Por lo tanto, se piensa que las dos células se determinan entre sí antes de sus respectivos acontecimientos de diferenciación. Cuando la proteína LIN-12 es utilizada nuevamente durante la formación de la vulva, ésta es activada por el linaje primario de la vulva para impedir que las células laterales de la vulva formen un fenotipo central de la vulva (véase fig. 6-19).

La decisión célula ancla/precursor uterino ventral pone de manifiesto dos importantes aspectos de la determinación en dos células originalmente equivalentes. En primer lugar, la diferencia inicial entre las dos células es creada por azar. En segundo lugar, esta diferencia inicial es reforzada por retroalimentación. Tal mecanismo es también visto en la determinación de cuál de las células epidérmicas originalmente equivalentes del embrión de insecto generarán las neuronas del sistema nervioso periférico. Aquí, la elección es entre llegar a ser célula de la piel (célula hipodérmica) o una célula precursora neural (un **neuroblasto**). El gen *Notch* de *Drosophila*, tal como su homólogo de *C. elegans*, *lin-12*, canaliza a una célula bipotencial en uno de dos caminos alternativos. Poco después de la gastrulación, una región de cerca de 1800 células ectodérmicas se localiza a lo largo de la línea media ventral del embrión de *Drosophila*. Estas células, conocidas como células ectodérmicas neurogénicas, tienen el potencial para formar el cordón nervioso ventral del insecto. Cerca de un cuarto de estas células llegará a ser neuroblastos, mientras que el resto se convertirá en precursores de la hipodermis. Las células que darán origen a neuroblastos están entremezcladas con aquellas que llegarán a ser precursores hipodérmicos. Por lo tanto, cada célula ectodérmica neurogénica puede dar origen a células precursoras hipodérmicas o neurales (Hartenstein y Campos-Ortega 1984). Ante la ausencia de la transcripción del gen *Notch* en el embrión, estas células se desarrollan exclusivamente a neuroblastos, en lugar de una mezcla de células precursoras hipodérmicas y neurales (Artavanis-Tsakonis y col. 1983; Lehmann y col. 1983). Estos embriones mueren, teniendo un grave exceso de células neurales a expensas de la hipodermis ventral y de la cabeza (Poulson 1937; Hoppe y Greenspan 1986).

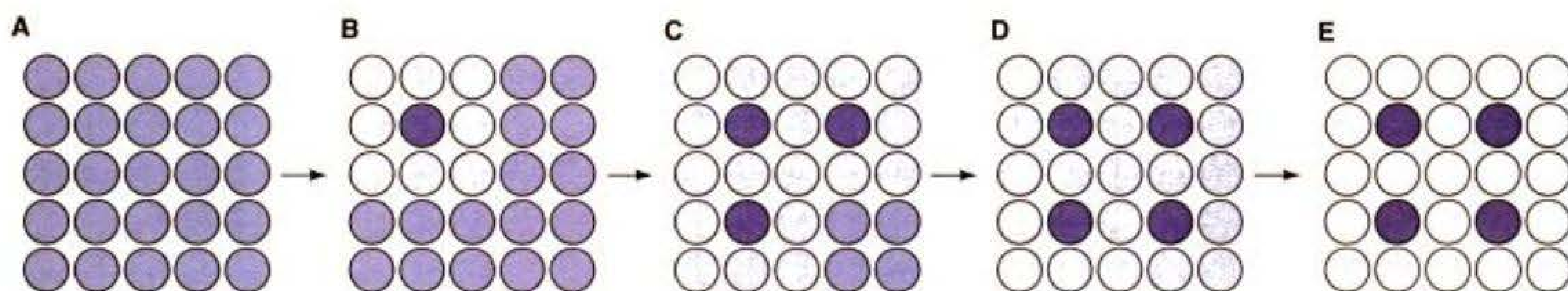


Fig. 6–31. Modelo para explicar el patrón de espaciado de los neuroblastos entre las células ectodérmicas neurogénicas equivalentes. **A.** Un campo de células equivalentes, que señalizan y reciben equitativamente. **B.** Un acontecimiento casual provoca que una de las células (sombreada más oscuro) genere más señal. Las células que la rodean reciben esta elevada cantidad de señal y reducen su propio nivel de señal (sombreado más claro). **C.** El resto del patrón está ahora forzado. Aquellas células que han regulado en menos sus propias señales (en respuesta a los acontecimientos de B) tienen menos probabilidad de expresar más señal que sus células vecinas. Las células rodeadas por señalizadoras reguladas en menos tienen más probabilidades de llegar a ser señalizadoras. **D, E.** Los destinos de las células a lo largo del campo llegan a ser especificados cuando la amplificación de la señal genera poblaciones señalizadoras rodeadas por poblaciones receptoras. En el caso de las células neurogénicas, se piensa que la señal es la proteína Delta, y el receptor es la proteína Notch. (Según Greenwald y Rubin 1992.)

Heitzler y Simpson (1991) propusieron que la proteína Notch, como LIN-12, sirve como un receptor para las señales intracelulares involucradas en la diferenciación de las células equivalentes. Además, ellos proporcionaron evidencia que indica que Delta es el ligando para Notch. Los mosaicos genéticos muestran que mientras que Notch es necesaria en las células que llegarán a ser hipodérmicas, Delta es necesaria en las células que inducen al fenotipo hipodérmico.

Greenwald y Rubin (1992) han propuesto un modelo basado en la hipótesis de LIN-12 para explicar el espaciamiento de los neuroblastos en estos grupos (clusters) proneurales de los precursores epidérmicos y neurales (fig. 6-31). Inicialmente, todas las células ectodérmicas neurogénicas tienen potenciales equivalentes y producen las mismas señales. Sin embargo, cuando una de estas células, por azar, produce más señal (decir, proteína Delta), activa a los receptores de las células adyacentes y reduce sus niveles de señalización. Como sus niveles de señalización están disminuidos, las vecinas de estas células con baja señal tenderán a hacerse señalizadoras de nivel alto. De este modo, se produce un espaciado de neuroblastos.

La matriz extracelular como fuente de señales críticas del desarrollo

PROTEÍNAS Y FUNCIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. La **matriz extracelular** consiste de macromoléculas secretadas por células en su ambiente inmediato. Estas macromoléculas forman una región de material no celular en el intersticio entre las células. La matriz extracelular es una región crítica para la mayor parte del desarrollo animal. La adhesión celular, la migración celular y la formación de láminas y tubos epiteliales dependen de la capacidad de las células para formar uniones a la matriz extracelular. En algunos casos, como en la formación de los epitelios, estas uniones tienen que ser sumamente fuertes. En otros ejemplos, como cuando las células migran, las uniones tienen que ser hechas, y rehechas. En algunos casos, la matriz extracelular sirve simplemente como un sustrato permisivo sobre el cual las células pueden adherirse, o sobre el que pueden migrar. En otros casos, la matriz extracelular proporciona las direcciones para el movimiento celular o la señal para un acontecimiento de desarrollo.

Las matrices extracelulares están constituidas por colágeno, proteoglucanos, y una variedad de moléculas de glucoproteínas especializadas, como fibronectina y laminina. Estas grandes glucoproteínas son responsables de la organización de la matriz y de las células en una estructura ordenada. La **fibronectina** es un dímero de glucoproteína muy grande (460 kDa) sintetizada por numerosos tipos celulares. Una función de la fibronectina es servir como una molécula de adhesión general, uniendo células entre sí y a otros sustratos, como colágeno y proteoglucanos. La fibronectina tiene varios sitios de unión diferentes, y sus interacciones con las moléculas apropiadas resultan en la correcta alineación de las células con su matriz extracelular (fig. 6-32). Como se verá en capítulos posteriores, la fibronectina tiene también un papel importante en la migración celular. Las "carreteras" sobre las que viajarán ciertas células migrantes están pavimentadas con esta proteína. Los senderos de fibronectina llevan a las células germinales hacia las gónadas y a las células del corazón hacia la línea media del embrión. Si los embriones de pollo son inyectados con anticuerpos para fibronectina, las células que forman el corazón no pueden alcanzar la línea media, y se desarrollan dos corazones separados (Heasman y col. 1981; Linask y Lash 1988).

La **laminina** y el **colágeno tipo IV** son los principales componentes de un tipo de matriz extracelular denominada **lámina basal**. La lámina basal es característica de las láminas estrechamente tejidas que rodean al tejido epitelial (fig. 6-33). La adhesión de las células epiteliales a la laminina (sobre la cual se sientan) es mucho mayor que la afinidad de las células mesenquimáticas para la

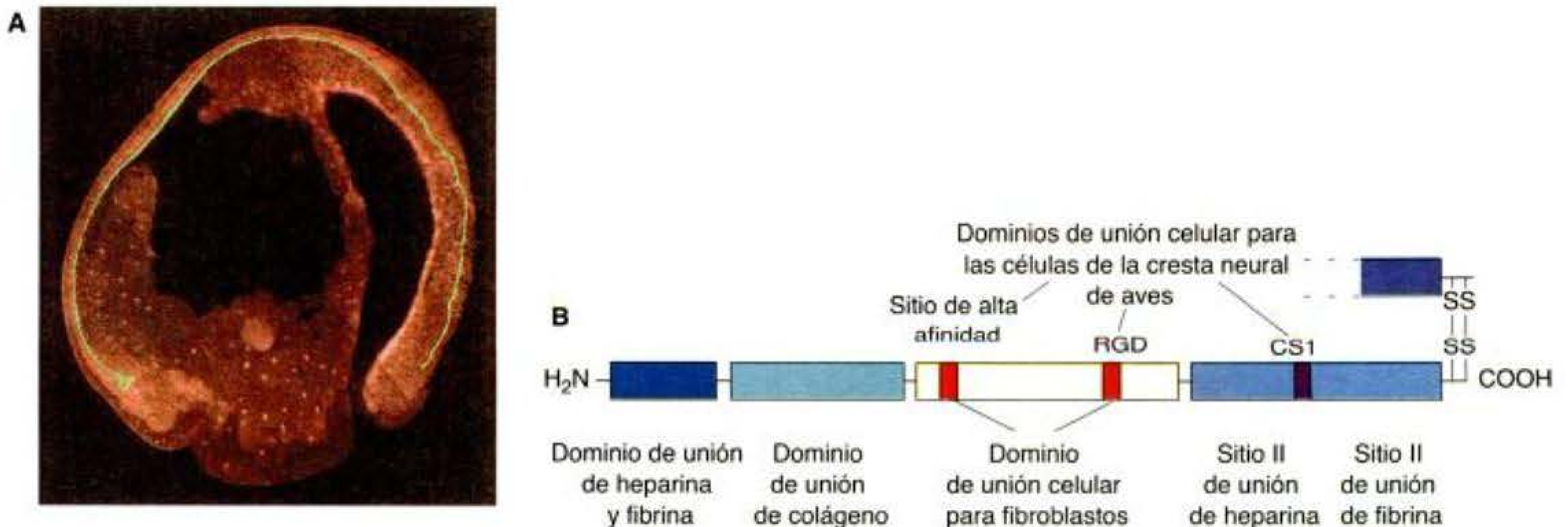


Fig. 6-32. Fibronectina en el embrión en desarrollo. **A.** Los anticuerpos fluorescentes para fibronectina en el embrión de *Xenopus* durante la gastrulación muestran a la fibronectina acumulada como una banda verde. La fibronectina orientará los movimientos de las células mesodérmicas. **B.** Estructura y dominios de unión de la fibronectina. Los rectángulos representan dominios de resistencia a las proteasas. El dominio de unión fibroblástico consiste de dos unidades, el sitio RGD y el sitio de alta afinidad, siendo ambos esenciales para la unión de la célula. Otro sitio de unión para las células de la cresta neural de las aves es necesario para que estas células migren sobre el sustrato de la fibronectina. Otras regiones de la fibronectina permiten la unión del colágeno, la heparina y de otras moléculas de la matriz extracelular. (A, fotografía cortesía de M. Marsden y D. W. DeSimone; B, según Dufour y col. 1988.)

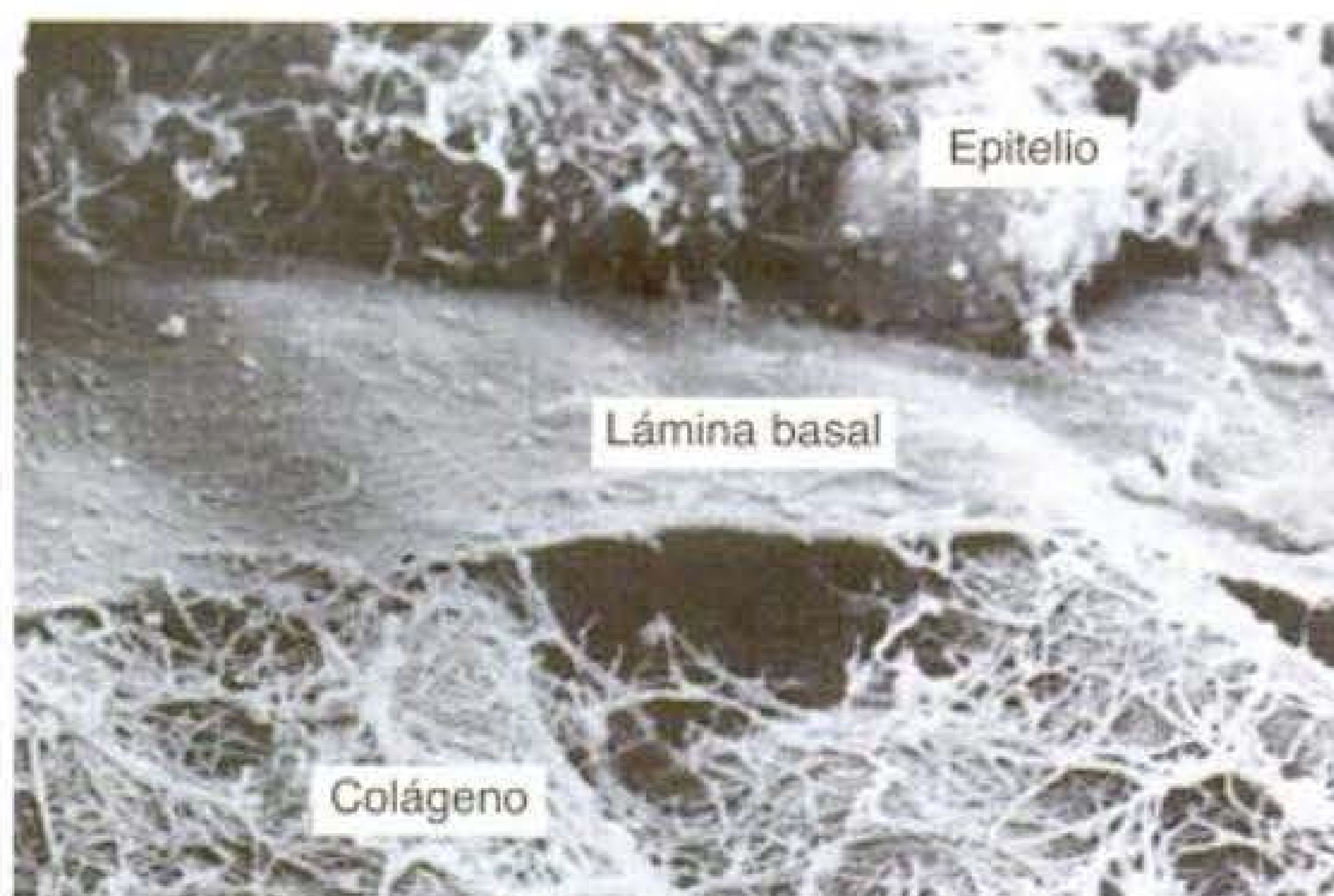


Fig. 6-33. Localización y formación de las matrices extracelulares en el embrión de pollo. Esta microfotografía electrónica de barrido muestra la matriz extracelular en la unión de las células epiteliales (arriba) y las células mesenquimáticas (abajo). Las células epiteliales sintetizan una apretada lámina basal, compuesta de laminina, mientras que las células mesenquimáticas sintetizan una lámina reticular laxa hecha primariamente de colágeno. (Fotografía cortesía de R. L. Trelsted.)

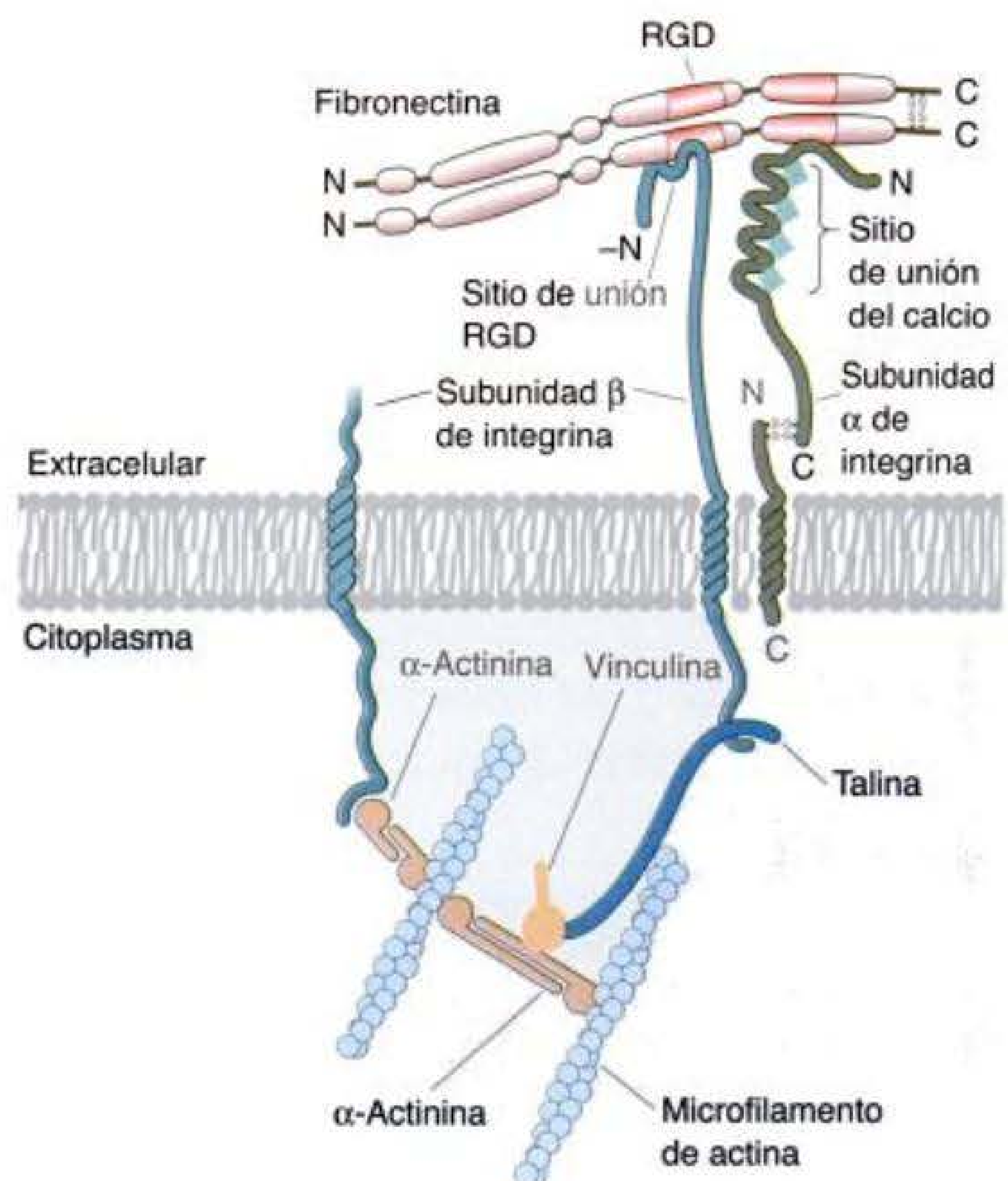


Fig. 6-34. Diagrama especulativo sobre la unión del citoesqueleto a la matriz extracelular a través de la molécula de integrina. (Según Luna y Hitt 1992.)

fibronectina (sobre la cual ellas deben unirse y liberarse si tienen que migrar). Como la fibronectina, la laminina juega un papel en el ensamblaje de la matriz extracelular, promoviendo la adhesión y el crecimiento, cambiando la forma celular, y permitiendo la migración celular (Hakamori y col. 1984).

INTEGRINAS, LOS RECEPTORES PARA LAS MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. La capacidad de una célula para unirse a glucoproteínas adhesivas depende de su expresión de receptores de membrana para los sitios de unión celular de estas moléculas grandes. El principal receptor de fibronectina fue identificado mediante el uso de anticuerpos que bloquean la unión de las células a la fibronectina (Chen y col. 1985; Knudsen y col. 1985). Se observó que el complejo del receptor de fibronectina no une solamente a la fibronectina sobre el exterior de la célula, sino que además une a proteínas del citoesqueleto sobre el interior celular. Por lo tanto, el complejo del receptor de fibronectina aparece atravesando la membrana celular y uniendo a dos tipos de matrices. Sobre el exterior de la célula, se une a la fibronectina de la matriz extracelular; sobre el interior de la célula, sirve como un sitio de anclaje para los microfilamentos de actina que mueven la célula (fig. 6-34). Horwitz y col. (1986; Tamkun y col. 1986) han denominado a esta familia de receptores proteínas **integrinas** debido a que ellas integran los andamios extracelular e intracelular, permitiéndoles trabajar en conjunto. Sobre el lado extracelular, las integrinas se unen a la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD), hallada en varias proteínas adhesivas en las matrices extracelulares, incluyendo la fibronectina, la vitronectina (encontrada en la lámina basal de los ojos), y la laminina (Ruoslahti y Pierschbacher 1987). Sobre el lado citoplasmático, las integrinas se unen a talina y a α-actinina, dos proteínas que se asocian a los microfilamentos de actina. Esta unión doble le permite a la célula moverse contrayendo los microfilamentos de actina contra la matriz extracelular fija.

Bissell y col. (1982; Martins-Green y Bissell 1995) han demostrado que la matriz extracelular es capaz de inducir la expresión de genes específicos en los tejidos en desarrollo, especialmente aquellos del hígado, testículo y glándula mamaria. En estos tejidos la inducción de factores de transcripción específicos depende de la unión de la célula sobre el sustrato (fig. 6-35; Liu y col. 1991; Streuli y col. 1991; Notenboom y col. 1986). A menudo, la presencia de integrinas unidas evita la activación de genes que especifican apoptosis (Montgomery y col. 1994; Frisch y Ruoslahti 1997). Los condrocitos que producen el cartílago de nuestras vértebras y de las extremidades pueden sobrevivir y diferenciarse únicamente si están rodeados por una matriz extracelular y si están unidos a la matriz extracelular a través de sus integrinas (Hirsch y col. 1997). Si condrocitos a partir del esternón del pollo en desarrollo son incubados con anticuerpos que bloquean la unión de las integrinas a la matriz extracelular, ellos se encogen y mueren. Mientras siguen siendo polémicos los mecanismos mediante los cuales la unión de las integrinas inhibe la apoptosis (véase Howe y col. 1998), las matriz extracelular es obviamente una importante fuente de señales que pueden ser transducidas en el núcleo para producir una expresión de genes específica.

Están siendo identificados algunos de los genes inducidos por la unión a la matriz. Cuando el cultivo de tejidos es colocado sobre plástico, las células de la glándula mamaria se dividirán (fig. 6-36). En efecto, son expresados los genes para la división celular (*c-myc, ciclinaD1*), mientras no son expresados los genes para los productos diferenciados de la glándula mamaria

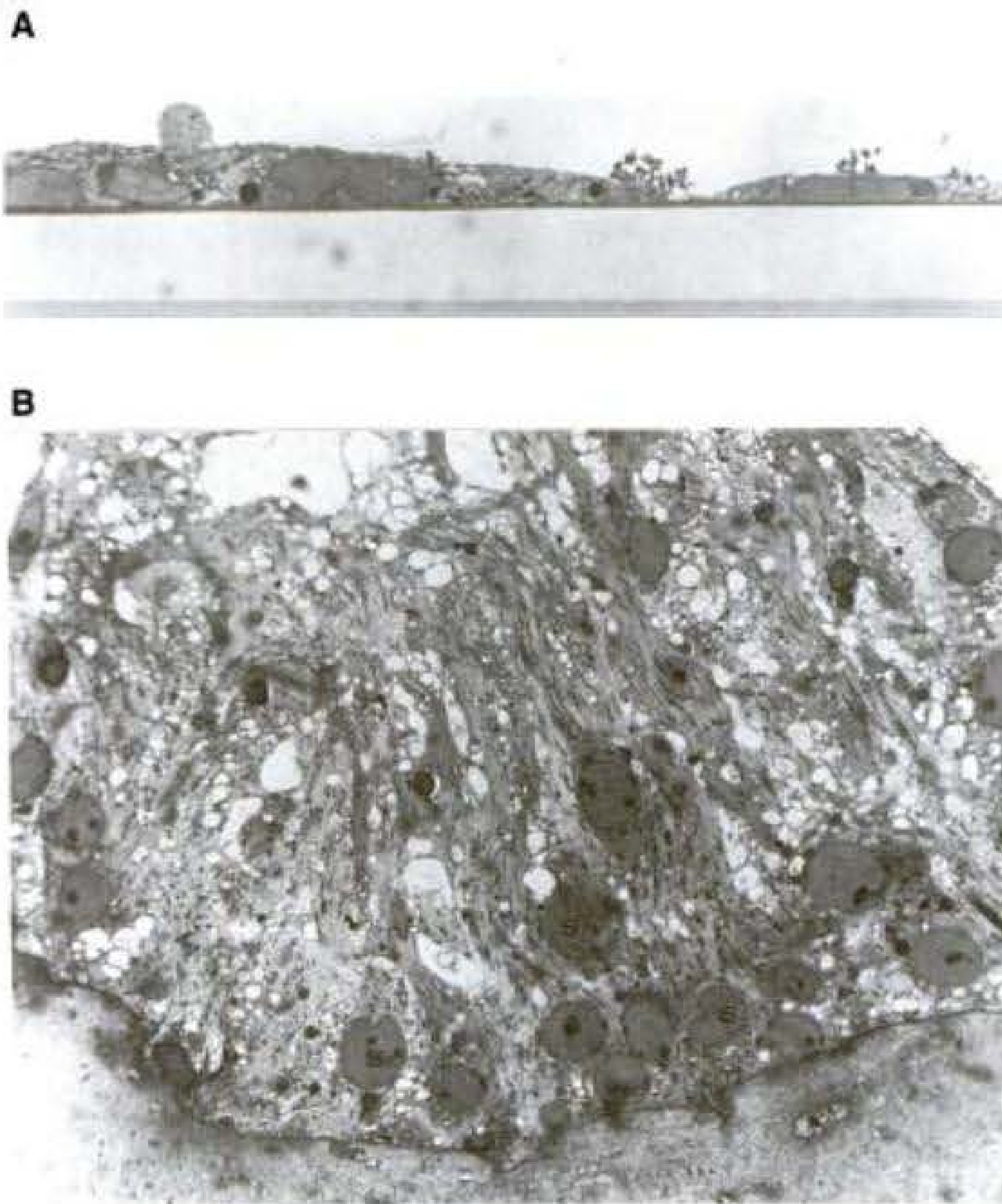


Fig. 6-35. Función de la matriz extracelular en la diferenciación celular. Microfotografías al microscopio óptico de células de Sertoli del testículo de la rata que crecieron por dos semanas **A.** En tejidos cultivados sobre placas de plástico y **B.** Sobre placas cubiertas con lámina basal. Las dos fotografías fueron tomadas con el mismo aumento, x1200. (De Hadley y col. 1985; fotografías cortesía de M. Dym.)

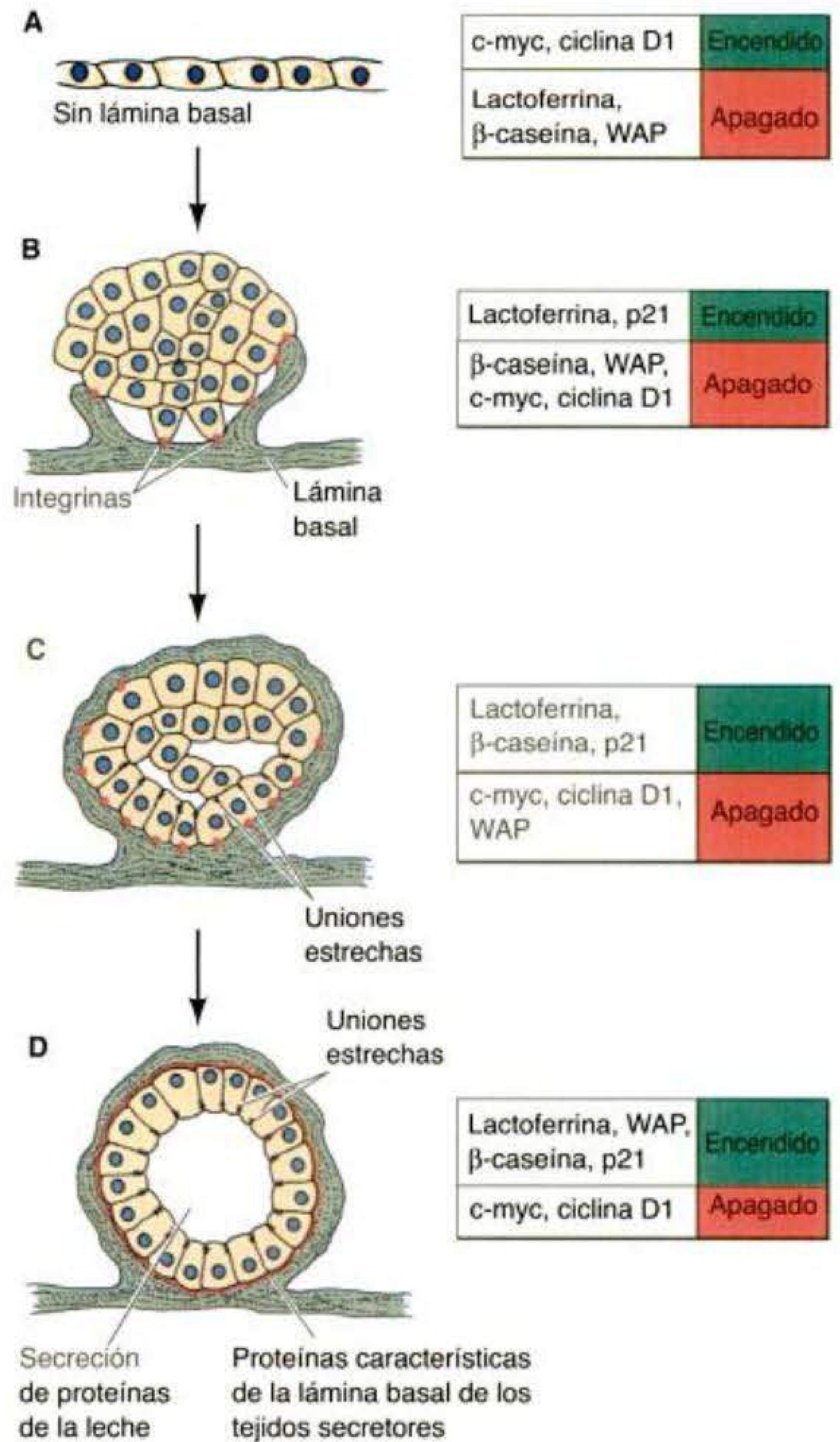


Fig. 6-36. Expresión de genes en el tejido de la glándula mamaria dirigida por la membrana basal. **A.** El tejido de la glándula mamaria de ratón se divide cuando es colocado sobre un cultivo de tejidos de plástico. Son encendidos los genes que codifican las proteínas de la división celular, y son apagados los genes capaces de sintetizar los productos diferenciados de la glándula mamaria lactoferrina, caseína, proteína ácida del suero (WAP). **B.** Cuando estas células son colocadas sobre una membrana basal que contiene laminina (lámina basal), se apagan los genes para las proteínas de la división celular, mientras que son encendidos los genes que inhiben la división celular (p21) y los genes para lactoferrina. **C, D.** Las células de la glándula mamaria envuelven la lámina basal alrededor de ellas, formando un epitelio secretor. Los genes para caseína y la proteína ácida del suero son activados secuencialmente. (Según Bissell y col. 2003.)

(caseína, lactoferrina, proteína ácida de suero). Si las mismas células son colocadas sobre plástico cubierto con una membrana basal conteniendo laminina, las células detienen su división y se expresan los genes de diferenciación de la glándula mamaria. Esto sucede únicamente después que las integrinas de las células de la glándula mamaria se unen a la laminina de la membrana basal extracelular. Luego es expresado el gen para la lactoferrina, al igual que el gen p21, un inhibidor de la división de la célula. Los genes *c-myc y ciclinaD1* dejan de ser expresados. Finalmente, son expresados los genes para los productos de desarrollo de la glándula mamaria, y se mantienen apagados los genes de la división celular. Por este tiempo, las células de la glándula mamaria se han autorodeado por una lámina basal, formando un epitelio secretor similar al del tejido de la glándula mamaria. La unión de las integrinas a la laminina es esencial para la transcripción del gen de la caseína, y las integrinas actúan de manera coordinada con la prolactina (véase fig. 6-22) para activar la expresión de este gen (Roskelley y col. 1994; Muschler y col. 1999).

Estudios recientes han demostrado que la unión de las integrinas a la matriz extracelular puede estimular la vía del RTK. Cuando una integrina sobre la membrana celular de una célula se une a la fibronectina o al colágeno secretado por una célula vecina, la integrina puede activar la cascada del RTK a través de un complejo adaptador parecido a una proteína que asocia a la integrina con la proteína Ras G (fig. 6-37A; Wary y col. 1998). Las caderinas y otras moléculas de adhesión (véase cap. 3) pueden además transmitir señales mediante "el secuestro" de receptores de FGF (Williams y col. 1994b; Clark y Brugge 1995). Las caderinas, por ejemplo, son capaces de unirse a la región citoplasmática de los receptores de FGF y de ese modo dimerizar a estos receptores, tal como lo hacen los ligandos normales de FGF (fig. 6-37B; Williams y col. 1994a; Doherty y Walsch 1996).

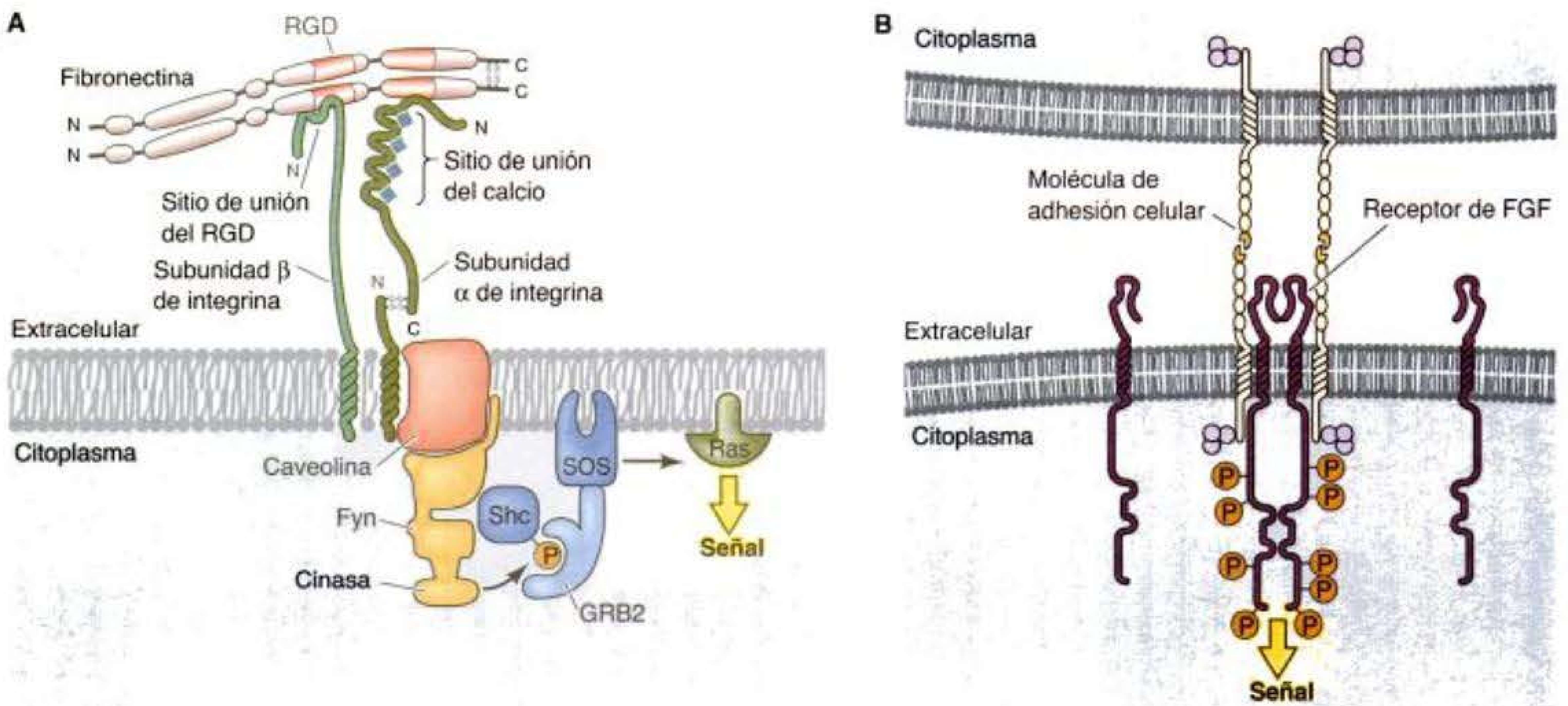


Fig. 6-37. Dos tipos de activación mediante las moléculas de adhesión celular. **A.** Las moléculas de adhesión celular al sustrato tales como las integrinas pueden transmitir una señal a partir de la porción citoplasmática de la proteína integrina a la proteína Ras G a través de una cascada que involucra a las proteínas caveolina y Fyn. **B.** Los receptores de FGF pueden ser "secuestrados" por moléculas de adhesión celular y dimerizados. Pueden ser reunidos por la interacción de moléculas de adhesión celular opuestas, o la "reticulación" (*crosslinking*) de los receptores de FGF mediante la aposición de la membrana celular podría activar sus dominios de cinasa. (A, según Wary y col. 1998.)

Transmisión directa de las señales a través de las uniones comunicantes

A través de este capítulo se ha discutido la transmisión de las señales por los receptores de la membrana celular. En estos casos, el receptor es alterado de un cierto modo mediante la unión de un ligando, de modo tal que su dominio citoplasmático transmite la señal en la célula. Otro mecanismo de señalización transmite pequeñas moléculas solubles de señal directamente a través de la membrana celular, porque la membrana no es continua en todos los lugares; estructuras denominadas **uniones comunicantes** (o **uniones nexo,** o de **hendidura,** (del inglés *gap junctions*) sirven como canales de comunicación entre células adyacentes (fig. 6-38A,B). Las células conectadas por uniones comunicantes se dice que están "acopladas," y que pequeñas moléculas (peso molecular <1500) e iones pueden pasar libremente desde una célula a la otra. En la mayoría de los embriones, al menos algunas de las blastómeras tempranas están conectadas mediante uniones comunicantes. Estas uniones les permiten a las láminas epiteliales (es decir, células estrechamente conectadas) trabajar juntas. Además, la capacidad de las células para formar uniones comunicantes con algunas células y no con otras genera "compartimentos" fisiológicos dentro del embrión en desarrollo (fig. 6-38C).

Los canales de las uniones comunicantes están hechos de proteínas de **conexina**. En cada célula, seis conexinas idénticas agrupadas en la membrana celular forman un canal de transmembrana con un poro central. El complejo del canal de una célula conecta con el complejo del canal de otra célula, uniendo los citoplasmas de ambas células (fig. 6-38D). Diferentes tipos de proteínas de conexina tienen en el desarrollo normal papeles separados pero superpuestos. Por ejemplo, la conexina-43 es hallada en casi cada tejido del embrión de ratón en desarrollo. Sin embargo, el embrión de ratón se desarrollará todavía aún si los genes de la conexina-43 son "noqueados" *(knocked out)* mediante la inactivación génica dirigida (véase cap. 4). Parece que la mayoría de las funciones de la conexina-43 puede ser asumida por otras proteínas de conexina relacionadas –pero no todas–. Poco después del nacimiento, el ratón deficiente de conexina-43 realiza respiraciones entrecortadas, se vuelve azulado y muere. Las autopsias de estos ratones muestran que el ventrículo derecho (la cámara que bombea sangre a través de la arteria pulmonar hacia los pulmones) es ocupado con tejido que ocluye la cámara y obstruye el flujo sanguíneo (Reaume y col. 1995; Huang y col. 1998). Aunque la pérdida de la proteína conexina-43 puede ser compensada en muchos tejidos, parece ser crítica para el desarrollo normal del corazón.

> SITIO WEB 6-9 **Mutaciones de las conexinas (Conexin mutations).** Las mutaciones en las proteínas conexinas humanas causan anomalías del desarrollo del corazón y del oído. En muchos casos, una conexina puede ser sustituida por otra, pero cuando la conexina no puede ser compensada, da como resultado un fenotipo mutante.

La importancia de las uniones comunicantes en el desarrollo ha sido demostrada en embriones de anfibios y de mamíferos (Warner y col. 1984). Cuando se

A B C

EC
M
EN

D
Espacio intercelular (15-40 nm)
Comunicación de canales
Membranas celulares
Proteínas conexinas

Fig. 6-38. Uniones comunicantes. **A.** Microfotografía electrónica de una hilera de uniones comunicantes (las estructuras parecidas a una escalera entre las dos células) conectan dos células muy cercanas. **B.** Microfotografía de fluorescencia de uniones comunicantes en un túbulo renal de un embrión de ratón de 17 días. **C.** Se forman compartimentos por las proteínas de las uniones comunicantes entre las células que se comunican una con la otra. Este compartimento puede ser visto en la gástrula de ratón mediante la inyección de tinte amarillo Lucifer (*Lucifer yellow dye*) en una célula y viendo su transferencia a un pequeño grupo de células. (EC, ectodermo; EN, endodermo; M, mesodermo) **D.** Estructura de la subunidad de la unión comunicante. (**A**, de Peracchia y Dulhunty 1976; cortesía de C. Peracchia; **B**, de Sainio y col. 1992, cortesía de K. Sainio; **C**, de Kalimi y Lo 1988, cortesía de C. Lo; **D**, según Darnell y col. 1986.)

microinyectaron anticuerpos para conexinas dentro de una célula específica de una blástula de *Xenopus* de 8 células, la progenie de esa célula, que generalmente se asociaba mediante uniones comunicantes, deja de pasar iones o pequeñas moléculas de una célula a la otra. Los renacuajos obtenidos de estas blástulas tratadas mostraban defectos relacionados específicamente con el destino de desarrollo de la célula inyectada (fig. 6-39). La progenie de la célula inyectada no muere, pero son incapaces de desarrollarse normalmente (Warner y col. 1984). En el embrión de ratón, las 8 primeras blastómeras también están conectadas entre sí mediante uniones comunicantes. Aunque estas 8 células están asociadas laxamente entre sí, se mueven juntas para formar un embrión compactado. Si la compactación es inhibida por anticuerpos contra conexinas, las blastómeras tratadas continúan dividiéndose, pero posteriormente el desarrollo se interrumpe (Lo y Gilula 1979; Lee y col. 1987). Si un RNA antisentido para mensajeros de conexinas es inyectado en una de las blastómeras de un embrión de ratón normal, esa célula no formará uniones comunicantes y no será incluida en el embrión (Bevilacqua y col. 1989).

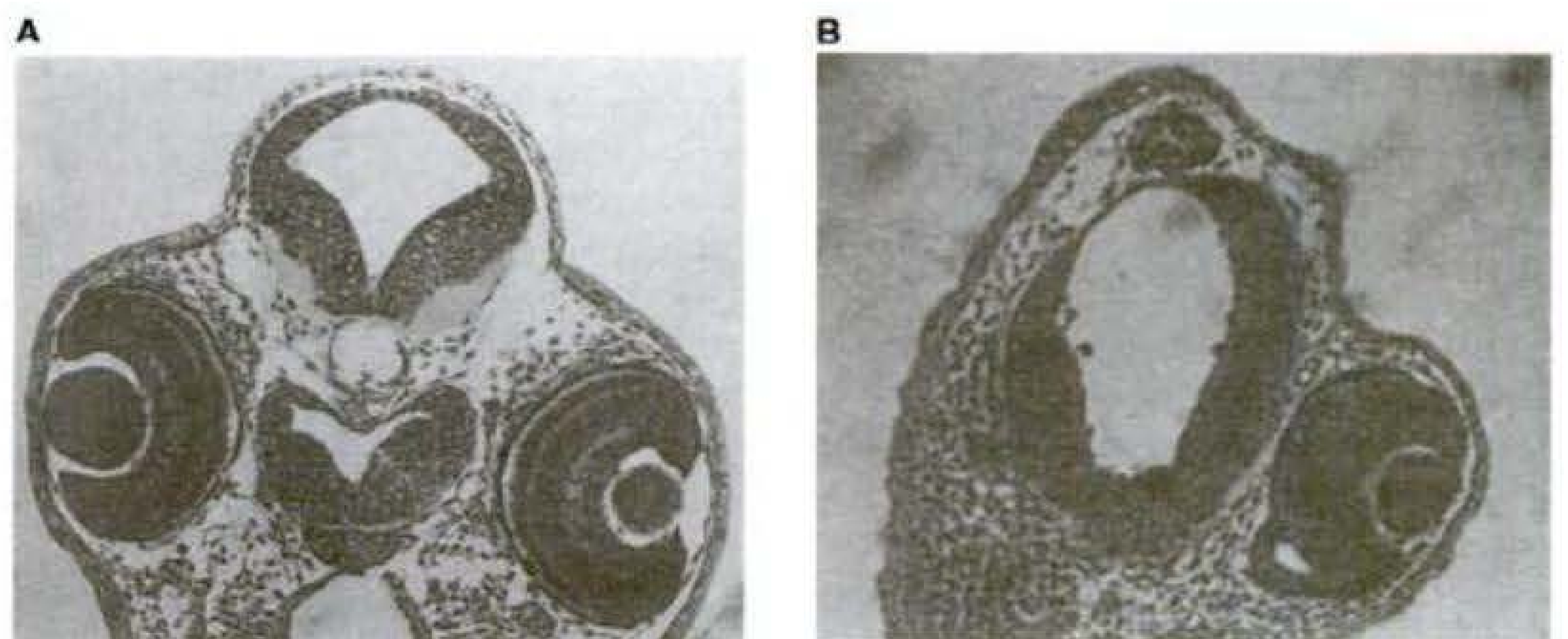


Fig. 6-39. Efectos del desarrollo de las uniones comunicantes. Secciones a través de un renacuajo de *Xenopus* en el que una de las blastómeras en el estadio de 8 células fue inyectada con **(A)** un anticuerpo control o **(B)** un anticuerpo contra conexinas. En el renacuajo tratado, el lado formado por la blastómera inyectada carece de ojo y tiene una morfología del cerebro anormal. (De Warner y col. 1984; fotografías cortesía de A. E. Warner.)

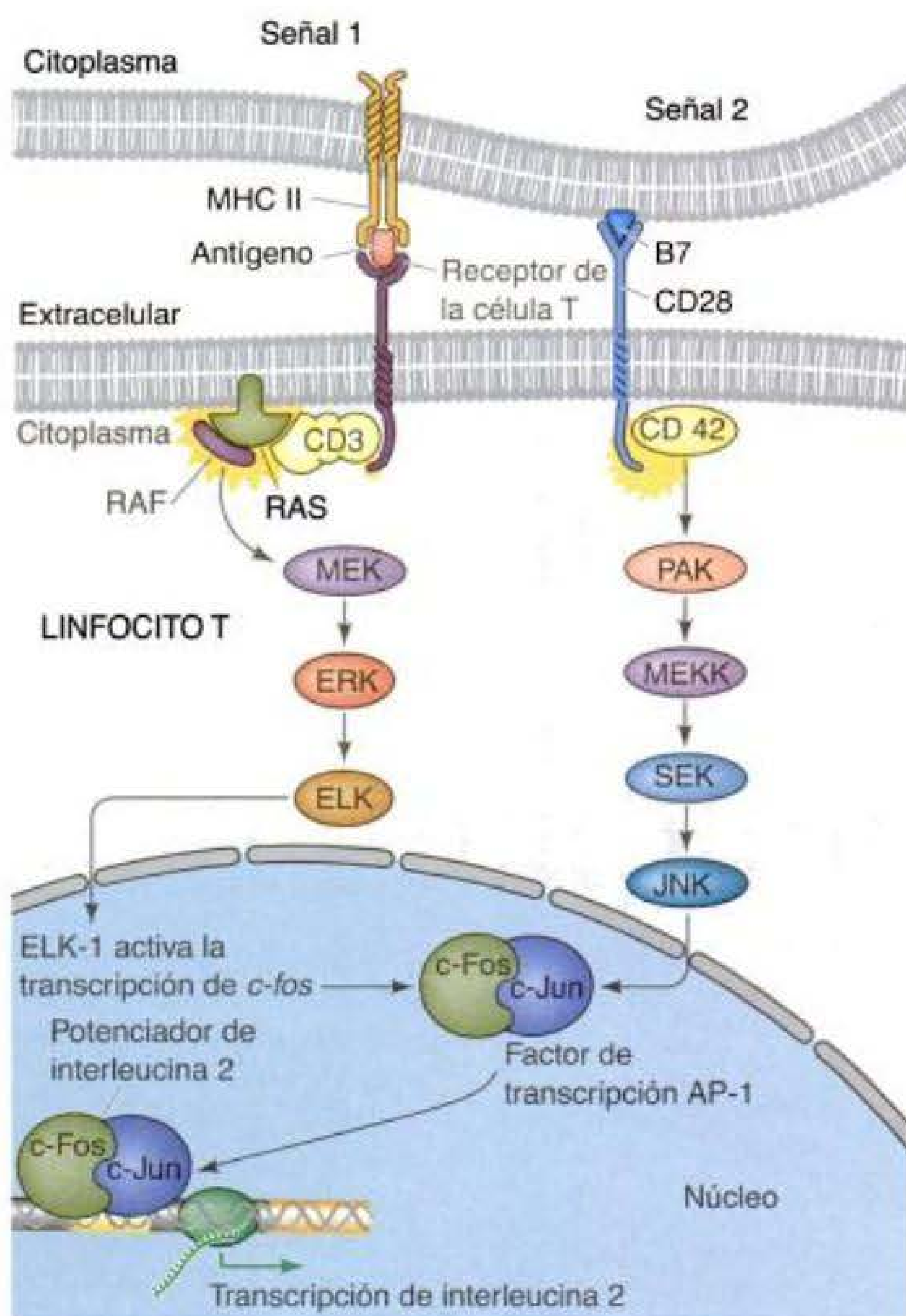


Fig. 6-40. Dos señales son necesarias para llevar a cabo la diferenciación del linfocito T. La primera señal viene de los receptores que unen al antígeno. La segunda señal viene de la unión de la proteína de transmembrana CD28 de la célula T a la proteína B7 sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. La primera señal dirige la síntesis de una subunidad del factor de transcripción AP-1, c-Fos. La segunda señal dirige la síntesis de otra subunidad, c-Jun. Juntas c-Fos y c-Jun forman el factor de transcripción AP-1, que puede activar a potenciadores específicos de la célula T como los que regulan la producción de interleucina 2.

Comunicación entre las vías

Se han representado las principales vías de transducción como si ellas fueran cadenas lineales a través de las cuales la información fluye en un solo conducto. Sin embargo, estas vías son justo las carreteras principales del flujo de la información. Entre ellas, las avenidas y las calles conectan una vía con otra. (Esto puede ser el porqué hay muchas etapas entre la superficie celular y el núcleo. Cada etapa es punto regulador potencial así como una intersección potencial.) Esta **interferencia** *(cross-talk)* puede ser vista en numerosos tejidos, en los cuales dos vías de señales se refuerzan entre sí. Se debe recordar que una célula tiene numerosos receptores y está recibiendo constantemente muchas señales al mismo tiempo.

En algunas células, la transcripción del gen requiere de dos señales diferentes. Este patrón es visto durante la diferenciación del linfocito, para el que son necesarias dos señales, cada una produciendo uno de los dos péptidos de un factor de transcripción necesario para la producción de interleucina 2 (IL-2, también conocida como factor de crecimiento celular T). Uno de estos péptidos, c-Fos, es inducido por la unión del receptor de la célula T a un antígeno (fig. 6-40). Esta señal activa a la vía del RTK, creando un factor de transcripción, Elk-1, que activa al gen c-fos para sintetizar c-Fos. La segunda señal viene de la glucoproteína B7 sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. Esta señal activa a una segunda cascada de cinasas, produciendo finalmente c-Jun. Los dos péptidos –c-Fos y c-Jun– se unen para producir la proteína AP-1, un factor de transcripción que se une al potenciador de la IL-2 y activa su expresión (Li y col. 1996).

También se ha visto que un receptor puede activar varias vías diferentes. Por ejemplo, los factores de crecimiento de fibroblasto pueden activar a la vía del RTK, la vía STAT, o aún una tercera vía que implica la renovación de lípidos e incrementa los niveles de los iones calcio en la célula.

Mantenimiento del estado diferenciado

El desarrollo obviamente significa más que el comienzo de la expresión del gen. Para que una célula llegue a ser comprometida a un fenotipo particular, la expresión del gen debe ser mantenida. Hay cuatro modos principales que han evolucionado naturalmente para mantener la diferenciación una vez que ésta se ha iniciado (fig. 6-41). En primer lugar, el factor de transcripción cuyo gen es activado por una cascada de transducción de una señal puede unirse al potenciador de su propio gen. En este sentido, una vez que el factor de transcripción es producido, su síntesis llega a ser independiente de la señal que lo indujo originalmente. El factor de transcripción MyoD en las células musculares es producido de este modo. En segundo lugar, una célula puede estabilizar su diferenciación por la síntesis de proteínas que actúan sobre la cromatina para mantener al gen accesible. Tales proteínas incluyen a la familia Trithorax. En tercer lugar, una célula puede mantener su diferenciación de un modo autocrino. Si la diferenciación es dependiente de una particular molécula señalizadora, la célula puede producir esta molécula señalizadora y el receptor de esta molécula. Las células de Sertoli de los testículos de mamífero pueden mantener su diferenciación mediante este bucle autocrino autoestimulatorio. En cuarto lugar, la célula puede interactuar con sus células vecinas de modo tal que cada una estimula la diferenciación de la otra, y la parte del fenotipo diferenciado de cada vecina es la producción de un factor paracrino que estimula el fenotipo de la otra. Este tipo de estrategia "rasguño tu espalda tú rasguñas la mía" es hallado en las células vecinas del desarrollo de los miembros de vertebrados y en los segmentos de insectos.

Cierre

En 1782, el ensayista Francés Denis Diderot planteó la pregunta de la morfogénesis en el sueño febril de un físico notable. Este personaje podía imaginarse que el

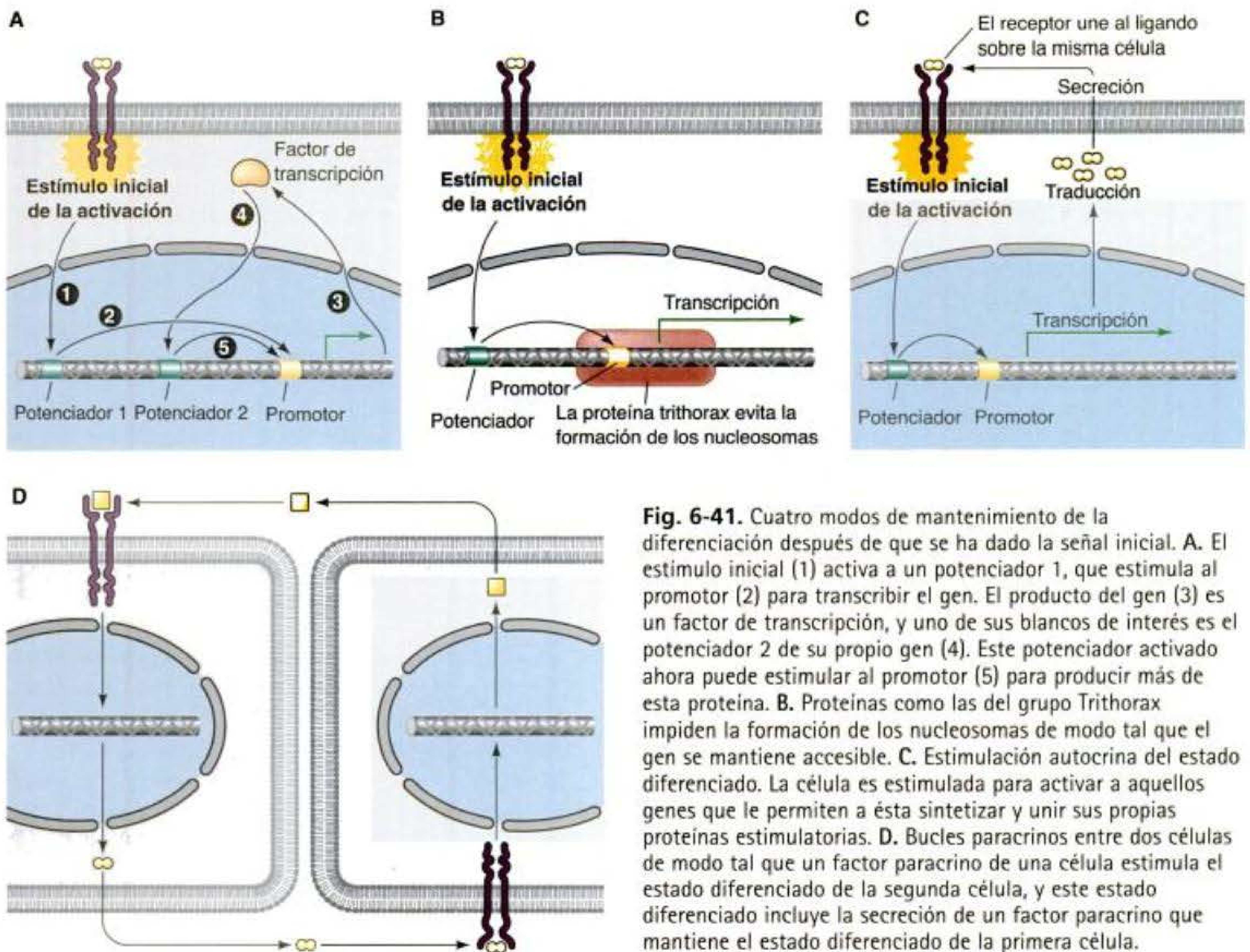


Fig. 6-41. Cuatro modos de mantenimiento de la diferenciación después de que se ha dado la señal inicial. **A.** El estímulo inicial (1) activa a un potenciador 1, que estimula al promotor (2) para transcribir el gen. El producto del gen (3) es un factor de transcripción, y uno de sus blancos de interés es el potenciador 2 de su propio gen (4). Este potenciador activado ahora puede estimular al promotor (5) para producir más de esta proteína. **B.** Proteínas como las del grupo Trithorax impiden la formación de los nucleosomas de modo tal que el gen se mantiene accesible. **C.** Estimulación autocrina del estado diferenciado. La célula es estimulada para activar a aquellos genes que le permiten a ésta sintetizar y unir sus propias proteínas estimulatorias. **D.** Bucles paracrinos entre dos células de modo tal que un factor paracrino de una célula estimula el estado diferenciado de la segunda célula, y este estado diferenciado incluye la secreción de un factor paracrino que mantiene el estado diferenciado de la primera célula.

cuerpo era formado a partir de innumerables "cuerpos sensibles diminutos" que se reunían para formar un agregado, pero él no podía imaginar cómo éste agregado podía llegar a ser un animal. Unos cien años más tarde, Charles Darwin escribió que el ojo debe haber evolucionado mediante pequeñas variaciones útiles, pero que no conocía los mecanismos por medio de los cuales se producía la complicada coordinación del desarrollo del ojo.

Estudios recientes han demostrado que esta coordinación de células para formar órganos y organismos depende de moléculas sobre las superficies de las células embrionarias. Los inductores y sus respondedores competentes interactúan entre sí para instruir y coordinar el desarrollo posterior de las partes que lo componen. En los capítulos posteriores se verán más estrechamente algunas de estas interacciones morfogenéticas. A medida que se continúe el estudio del desarrollo animal, se encontrará que inducción y competencia proporcionan la base de la morfogénesis. Además, se encontrarán las mismas vías de transducción de la señal dondequiera que se mire, a través del reino animal y dentro de cada embrión en desarrollo. Nos encontramos en el estadio en el cual podemos comenzar el estudio de la embriogénesis temprana y ver la integración de los procesos organismal, genético y celular del desarrollo animal.

Principios de desarrollo: comunicación célula-célula

1. Las interacciones inductivas implican inducción y respuesta de los tejidos.
2. La capacidad para responder a una señal inductiva depende de la competencia de las células que responden.
3. La inducción recíproca se produce cuando dos tejidos que interactúan son inductores y competentes para responder a las señales de cada uno.
4. Las cascadas de acontecimientos inductivos son responsables de la formación de órganos.

5. Las inducciones regionalmente específicas pueden generar diferentes estructuras a partir del mismo tejido que responde.

6. La respuesta específica para un inductor es determinada por el genoma del tejido que responde.

7. Las interacciones yuxtacrinas son interacciones inductivas que tienen lugar entre las membranas celulares de células adyacentes o entre la membrana celular y la matriz extracelular secretada por otra célula.

8. Las interacciones paracrinas se producen cuando una célula o tejido secreta proteínas que inducen cambios en las células vecinas.

9. Los factores paracrinos son proteínas secretadas por células inductoras. Estos factores se unen a los receptores de la membrana celular en las células competentes que responden.

10. Las células competentes responden a los factores paracrinos a través de las vías de transducción de la señal. La competencia es la capacidad para unir y responder a los inductores, y con frecuencia es el resultado de una inducción previa.

11. Las vías de transducción de la señal comienzan con un factor paracrino o yuxtacrino causando un cambio conformacional en su receptor de membrana celular. La nueva forma da como resultado una actividad enzimática en el dominio citoplasmático de la proteína receptora. Esta actividad le permite al receptor fosforilar a otras proteínas citoplasmáticas. Finalmente, una cascada de tales reacciones activa a un factor de transcripción (o grupo de factores) que activan o reprimen la actividad de un gen específico.

12. La muerte celular programada es una de las respuestas posibles a un estímulo inductivo. La apoptosis es una parte crítica de la vida.

13. Las uniones comunicantes le permiten a los iones y pequeñas moléculas moverse entre las células y facilita la acción coordinada de células conectadas.

14. Hay comunicación entre las vías de transducción de la señal, que le permite a la célula responder a múltiples entradas simultáneamente.

15. El mantenimiento del estado diferenciado puede ser llevado a cabo mediante bucles de retroalimentación positiva involucrando factores de transcripción, factores autocrinos, o factores paracrinos.

Bibliografía citada

Adams, J. M. and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. Science 281: 1322-1326.

Artavanis-Tsakonis, S., M. A. T. Muskavitch and Y. Yedvobnick. 1983. Molecular cloning of Noch, a locus affecting neurogenesis in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1977-1981.

Aza-Blanc, P., P. A. Ramirez-Weber, M. P. Laget and T. B. Kornberg. 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. Cell 89: 1043-1053.

Baehrecke, E. H. 2002. How death shapes life during development. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3: 779-787.

Banerjee, U., P. J. Renfranz, J. A. Pollock and S. Benzer. 1987. Molecular characterization and expression of sevenless, a gene involved in neuronal pattern formation in the Drosophila eye. Cell 49: 281-291.

Bard, J. B. L. 1990. Morphogenesis: The Cellular and Molecular Processes of Developmental Anatomy. Cambridge University Press, Cambridge.

Barinaga, M. 1998a. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? Science 281: 1303-1304.

Barinaga, M. 1998b. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. Science 281:1302-1303.

Basler, K. and E. Hafen. 1989. Ubiquitous expression of sevenless: Position-dependent specification of cell fate. Science 243: 931-934.

Beachy, P. A. and 7 others. 1997. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biosynthesis and signaling. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 62: 191-204.

Behrens, J., J. P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl and W. Birchmeier. 1996. Functional interaction of β-catenin with the transcription factor LRF-1. Nature 382: 638-642.

Berset, T., E. Fröhl, G. Battu, S. Canevacini and A. Hajnal.2001. Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during C elegans vulval development. Science 291: 1055-1058.

Bevilacqua, A., R. Loch-Caruso and R. P. Erickson.1989. Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse preimplantation embryos. Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 5444-5448.

Bissell, M. I., H. G. Hall and G. Parry. 1982. How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol. 99: 31-68.

Bissell, M., I. S. Mian, D. Raditsky and E. Turley. 2003. Tissue-specificity: Structural cues allow diverse phenotypes form a constant genotype. In G. B. Muller and S. A. Newman (eds.), Origin of Organismal Form. MIT Press, Cambridge.

Bitgood, M. J. and A. P. McMahon. 1995. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. Dev. Biol. 172:126-158.

Bitgood, M. J., L. Shen and A. P. McMahon. 1996. Sertoli cell signalling by desert hedgehog regulates the male germline. Curr. Biol. 6: 293-304.

Bowtell, D. D. L., M. A. Simon and G. M. Rubin. 1989. Ommatidia in the developing Drosophila eye require and can respond to sevenless for only a restricted period. Cell 56: 931-936.

Briscoe, J., D. Guschin and M. Muller. 1994. Just another signalling pathway. Curr. Biol. 4: 1033-1036.

Brivanlou, A. H. and J. E. Darnell. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. Science. 295: 813-818.

Brown, N. L., C. A. Sattler, S. W. Paddock and S. B. Carroll. 1995. Hairy and Emc negatively regulate morphogenetic furrow progression in the Drosophila eye. Cell 80: 879-887.

Cadigan, K. M. and R. Nusse. 1997. Wnt signaling: A common theme in animal development. Genes Dev. 24: 3286-3306.

Cales, C., J. F. Hancock, C. J. Marshall and A. Hall. 1988. The cytoplasmic protein GAP is implicated as a target for regulation by the ras gene product. Nature 332: 548-551.

Carthew, R. W. and G. M. Rubin. 1990. Sevenin-absentia, a gene required for the specification of R7 cell fate in the Drosophila eye. Cell 63: 561-577.

Cecconi, F., G. Álvarez-Bolado, B. I. Meyer, K. A. Roth and P. Gruss. 1998. Apaf-l (CED-4 homologue) regulates programmed cell death in mammalian development. Cell 94: 727-737.

Chen, K. C. and C. T. Chien. 1999. Negative regulation of atonal in proneural cluster formation in Drosophila R8 photoreceptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5055-5060.

Chen, W. T., E. Hasegawa, T. Hasegawa, C. Weinstock and K. M. Yamada. 1985. Development of cell-surface linkage complexes in cultured fibroblasts. J. Cell Biol. 100: 1103-1114.

Chiang, C., L. T. Ying, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal and P. A. Beachy. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. Nature 383: 407-413.

Chitnis, A., D. Henrique, J. Lewis, D. Ish-Horowicz and C. Kintner. 1995. Primary neurogenesis in Xenopus embryos regulated by a homologue of the Drosophila gene Delta. Nature 375: 761-766.

Chou, W. H. and 7 others. 1999. Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of Drosophila: Evidence for induced and default cell-fate specification. Development 126: 607-616.

Clark, E. A. and J. S. Brugge. 1995. Integrin and signal transduction pathways: The road taken. Science 268: 233-239.

Cooper, M. K., J. A. Porter, K. E. Young and P. A. Beachy. 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to hedgehog signaling. Science 280: 1603-1607.

Crossley, P. H., G. Monowada, C. A. MacArthur and G. Martin. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of the chick limb development. Cell 84: 127-136.

Cvekl, A. and J. Piatigorsky. 1996. Lens development and crystallin gene expression: Many roles for Pax-6. BioEssays 18: 621-630.

Daniel, C. W. 1989. TGFβ1 induced inhibition of mouse mammary ductal growth: Developmental specificity and characterization. Dev. Biol. 134: 20-30.

Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore. 1986. Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York.

Deng, C., A. Wynshaw-Boris, F. Zhou, A. Kuo and P. Leder. 1996. Fibroblast growth factor receptor-3 is a negative regulator of bone growth. Cell 84: 911-921.

Dickson, B., F. Sprenger, D. Morrison and E. Hafen. 1992. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. Nature 360: 600-603.

Diderot, D. 1782. D'Alembert's Dream. Reprinted in J. Barzun and R. H. Bowen (eds.), Rameau's Nephew and Other Works (1956). Doubleday, Garden City, NY, p. 114.

Doherty, P. and F. S. Walsh. 1996. CAM-FGF receptor interactions: A model for axonal growth. Mol. Cell Neurosci. 8: 99-111.

Dokucu, M. E., S. L. Ziqursky and R. L. Cagan. 1996. Atonal, rough, and the resolution of proneural clusters in developing Drosophila retinal. Development 122: 139-147.

Dorsky, R. I., W. S. Chang, D. H. Rapaport and W. A. Harris. 1997. Regulation of neuronal diversity in the Xenopus retina by Delta signalling. Nature 385: 67-74.

Dufour, S., J.-L. Duband, M. I. Humphries, M. Obara, K. M. Yamada and J. P. Thiery. 1988. Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules. EMBO J. 7: 2661-2671.

Fan, C. M. and M. Tessier-Lavigne. 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. Cell 79: 1175-1186.

Frisch, S. M. and E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 701-706.

Fujiwara, M., T. Uchida, N. Osumi-Yamashita and K. Eto. 1994. Uchida rat (rSey): A new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. Differentiation 57: 31-38.

Furuta,Y. and B. L. M. Hogan.1998. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. Genes Dev. 12: 3764-3775.

Gilbert-Barness, E. and J. M. Opitz. 1996. Abnormal bone development: Histopathology and skeletal dysplasias. In M. E. Martini-Neri, G. Neri and J. M. Opitz (eds.), Gene Regulation and Fetal Development. March of Dimes Birth Defects Foundation Original Article Series 30: (1). Wiley-Liss, NewYork, pp. 103-156.

Goustin, A. S. and 9 others. 1985. Coexpression of the sis and myc protooncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. Cell 41: 301-312.

Graff, J. M., A. Bansal and D. A. Melton. 1996. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF-β superfamily. Cell 85: 479-487.

Grainger, R. M. 1992. Embryonic lens induction: Shedding light on vertebrate tissue determination. Trends Genet. 8: 349-356.

Green, D. R. 1998. Apoptotic pathways: Roads to ruin. Cell 94: 695-698.

Greenwald, I. and G. M. Rubin. 1992. Making a difference: The role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. Cell 68: 271-281.

Greenwald, I., P. W. Sternberg and H. R. Horvitz. 1983. The lin-12 locus specifies cell fates in Caenorhabditis elegans. Cell 34: 435-444.

Grobstein, C. 1956. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. Exp. Cell. Res. 10: 424-440.

Groner, B. and F. Gouilleux.1995. Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 587-594.

Gurdon, J. B., P. Harger, A. Mitchell and P. Lemaire. 1994. Activin signalling and response to a morphogen gradient. Nature 371: 487-492.





Muthukkarapan, V. R. 1965. Inductive tissue interaction in the development of the mouse lens in vitro. J. Exp. Zool. 159: 269-288.

Nakayama, A., M.-T. Nguyen, C. C. Chen, K. Opdecamp, C. A. Hodgkinson and H. Arnheiter. 1998. Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. Mech. Dev. 70: 155-166.

Nohno, T. W., Y. Kawakami, H. Ohuchi, A. Fujiwara, H. Yoshioka and S. Noji. 1995. Involvement of the sonic hedgehog gene in chick feather formation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 206: 33-39.

Nomura, M. and E. Li. 1998. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning, and craniofacial development. Nature 393: 786-790.

Notenboom, R. G. E., P. A. J. de Poer, A. F. M. Moorman and W. H. Lamers. 1996. The establishment of the hepatic architecture is a prerequisite for the development of a lobular pattern of gene expression. Development 122: 321-332.

Ogino, H. and K. Yasuda. 1998. Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-maf. Science 280: 115-118.

Ohkawara, B., S.-I. Iemura, P. ten Dijke and N. Ueno. 2002. Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. Curr. Biol. 12: 205-209.

Padgett, R. W., J. M. Wozney and W. M. Gelbart. 1993. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2905-2809.

Pennisi, E. 1998. How a growth control takes a wrong turn to cancer. Science 1439-1441.

Peracchia, C. and A. F. Dulhunty. 1976. Low resistance junctions in crayfish: Structural changes with functional uncoupling. J. Cell Biol. 70>419-439.

Poulson, D. F. 1937. Chromosomal deficiencies and the embryonic development of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci USA 23: 133-137.

Price, E. R. and 7 others. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes: c-Kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. Biol. Chem. 273: 17983-17986

Reaume, A. G. and 8 others. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin-43. Science 267: 1831-1834.

Reilly, K. M. and D. A. Melton. 1996. Short-range signaling by candidate morphogens of the TGF- family and evidence for a relay mechanism of induction. Cell 86: 743-754.

Reinke, R. and A. L. Zipursky. 1988. Cell-cell interaction in the Drosophila retina: The bride o sevenless gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. Cell 55: 321-330.

Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer and C. Tabin. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell 75: 1401-1416.

Ritvos, O., T. Tuuri, M. Eramaa, K. Sainio, K. Hilden, L. Saxén and S. F. Gilbert. 1995. Activin disrupts epithelial branching morphogenesis in developing murine kidney, pancreas, and salivary gland. Mech. Dev. 50: 229-246.

Roberts, D. S. and S. A. Miller. 1998. Apoptosis in cavitation of middle ear space. Anatomical Rec 251: 286-289.

Rodríguez, I., K. Araki, K. Khatib, I.-C. Martinou and P. Vassalli. 1997. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bc12. Dev Biol. 184: 115-121.

Roessler, E. and 7 others. 1996. Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. Nature Genet. 14: 357-360.

Roskelley, C. D., P. Y. Desprez and M. J. Bissell. 1994. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 12378-12382.

Rousseau, F. and 7 others. 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. Nature 371: 252-254.

Rubin, G. M. 1989. Development of the Drosophila retina: Inductive events studied at single cell resolution. Cell 57: 519-520.

Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 238: 491-497.

Saha, M. S. 1991. Spemann seeh through a lens. In S. F. Gilbert (ed.), A Conceptual History of Modern Embryology. Plenum Press, New York, pp. 91-108

Saha, M. S., C. L. Spann and R. M. Grainger. 1989. Embryonic lens induction: More than meets the optic vesicle. Cell Diff. Dev. 28: 1-17.

Sainio, K., S. F. Gilbert, E. Lehtonen, M. Nishi, N. M. Kumar, N. B. Gilula and L. Saxén. 1992. Differential expression of gap junction mRNAs and proteins in the developing murine kidney and in experimentally induced nephric mesenchymes. Development 115: 827-837.

Saudou, F., S. Finkbeiner, D. Dev,vs and M. E. Greenberg. 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions Cell 95: 55-66.

Saunders, J. W., Jr. 1980. Developmental Biology. Macmillan, New York.

Saunders, J. W., Jr. and J. F. Fallon. 1966. Cell death and morphogenesis. In M. Locke (ed.), Major Problems of Developmental Biology. Academic Press, New York, pp. 289-314.

Saunders, J. W., Jr., J. M. Cairns and M. T. Gasseling. 1957. The role of the apical ectodermal ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure of and inductive specificity of limb parts of the chick. J. Morphol. 101: 57-88.

Saxén, L., E. Lehtonen, M. Karkinen-Jaaskelainen, S. Nordling and J. Wartiovaara. 1976. Are morphogenetic tissue interactions mediated by transmissable signal substances or through cell contacts. Nature 259: 662-663.

Schroeder, E. H., J. A. Kisslinger and R. Kopan. 1998. Notch-l signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature 393: 382-386.

Seydoux, G. and I. Greenwald. 1989. Cell autonomy of lin-12 function in a cell fate decision in C. elegans. Cell 57: 1237-1246.

Shaham, S. and H. R. Horvitz. 1996. An alternatively spliced C. elegans ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. Cell 86: 201-208.

Shiang, R. and 7 others. 1994. Mutations in the transmembrane donain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. Cell 78: 335-342.

Shih, C. and R. A. Weinberg. 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell 29: 161-169.

Shin, S. H., P. Kogerman, E. Lindstrom, R. Toftgard and L. G. Biesecker. 1999. GL13 mutations in human disorders mimic Cubitus interruptus protein functions and locaiization. Proc. Natl. Acad Sci USA 96: 2880-2884.

Shulman, J. M., N. Perrimon and J. D. Axelrod. 1998. Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. Trends Genet. 14: 452-458.

Simske, J. S. and S. K. Kim. 1995. Sequential signaling during Caenorhabditis elegans vulval induction. Nature 375: 142-146.

Slavkin, H. C. and P. Bringas, L 1976. Epithelial mesenchymal interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. Dev. Biol. 50: 428-442.

Socolovsky, M., A. E. J. Fllon, S. Wang, C. Brugnara and H. F. Lodish. 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: A direct role for Stat5 in BCI-XL induction. Cell 98: 181-191.

Spemann, H. and O. Schotté. 1932. Über xenoplatische Transplantation als Mittel zur Analyse der embryonalen Induction. Naturwissenschaften 20: 463-467.

Spritz, R. A., L. B. Gielbel and S. A. Holmes. 1992. Dominant negative and loss-of-function mutations of the c-kit (mast/Stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. Am. J. Hum. Genet. 50: 261-269.

Stern, H. M., A. M. C. Brown and S. D. Hauschka. 1995. Myogenesis in paraxial mesoderm: Preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. Development 121: 3675-3686.

Sternberg, P. W. 1988. Lateral inhibition during vulval induction in Caenorhabditis elegans. Nature 335: 551-554.

Stokoe, D., S. G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons and J. F. Hancock. 1994. Activation of raf as well as recruitment to the plasma membrane. Science 264: 1463-1467.

Streuli, C. H., N. Bailey and M. J. Bissell. 1991. Control of mammary epithelial differentiation: Basement membrane induces tissue specific gene expression in the absence of cell-cell interactions and morphological polarity. J. Cell Biol. 115: 1383-1396.

Struhl, G. and A. Adachi. 1998. Nuclear access and action of Notch in vivo. Cell 93: 382-386.

Su, W.-C. S. and 8 others. 1997. Activation of Statl by mutant fibroblast growth factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. Nature 386: 288-292.

Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz and R. O. Hynes. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell 46: 271-282.

Tan, P. B., M. R. Lackner and S. K. Kim. 1998. MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-l/Ets/LIN31 WH transcription factor complex during C. elegans vulval induction. Cell 93: 569-580.

Thomas, L. 1992. The Fragile Species. Macmillan, New York.

Thut, C. J., R. B. Rountree, M. Hwa and D. M. Kingsley. 2001. A large-scale in situ screen provides molecular evidence for the induction of eye anterior structures by the developing lens. Dev. Biol. 231: 63-76.

Ting-Berreth, S. A. and C.-M. Chuong. 1996. Local delivery of TGFβ2 can substitute for placode epithelium to induce mesenchymal condensation during skin morphogenesis. Dev. Biol. 179: 347-359.

Tomlinson, A. 1988. Cellular interactions in the developing Drosophila eye. Development 104: 183-193.

Tomlinson, A. and D. F. Ready. 1987. Cell fate in the Drosophila ommatidium. Dev. Biol. 123: 264-276.

Vaahtokari, A., T. Aberg, J. Jernvall, S. Keranen and 1. Thesleff. 1996a. The enamel knot as a signalling center in the developing mouse tooth. Mech. Dev. 54: 39-43.

Vaahtokari, A., T. Aberg and I. Thesleff. 1996b. Apoptosis in the developing tooth: Association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. Development 122: 121-129.

Vaux, D. L., I. L. Weissman and S. K. Kim. 1992. Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. Science 258: 1955-1957.

Vogel-Hopker, A., T. Momose, H. Rohrer, K. Yasua, L. Ishihara and D. H. Rappaport. 2000. Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. Mech. Dev. 94: 25-36.

Waddington, C. H. 1940. Organisers and Genes. Cambridge University Press, Cambridge.

Wallberg, A. E., K. Pedersen, U. Lendahl and R G. Roeder. 2002. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by Notch intracelluiar domains in vitro. Mol Cell Biol. 22: 7812-7819.

Wang, S. and 7 others. 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. Neuron 21: 63-76.

Warner, A. E., S. C. Guthrie and N. B. Gilula. 1984. Antibodies to gap junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. Nature 311: 127-131.

Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo and F. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. Cell 94: 625-634.

Webster, M. K. and D. J. Donoghue. 1996. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. EMBO J. 15: 520-527.

Wessells, N. K. 1977. Tissue Interaction and Development. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA.

Wilkinson, H. A., K. Fitzgerald and I. Greenwald. 1994. Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a C. elegans cell fate decision. Cell 79: 1187-1198.

Williams, E. J., J. Furness, F. S. Walsh and P. Doherty. 1994a. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. Neuron 13: 583-594.

Williams, E. J., F. S. Walsch and P. Doherty. 1994b. Tyrosine kinase inhibitors can differentiaily inhibit integrin-dependent and CAM-dependent neurite outgrowth. J. Cell. Biol. 124: 1029-1037.

Winter, C. G., B. Wang, A. Ballew, A. Royou, R. Karess, J. D. Axelrod and L. Luo. 2001. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. Cell 105: 81-91.

Witte, O. N. 1990. Steel locus defines new multipotent growth factor. Cell 63: 5-6.

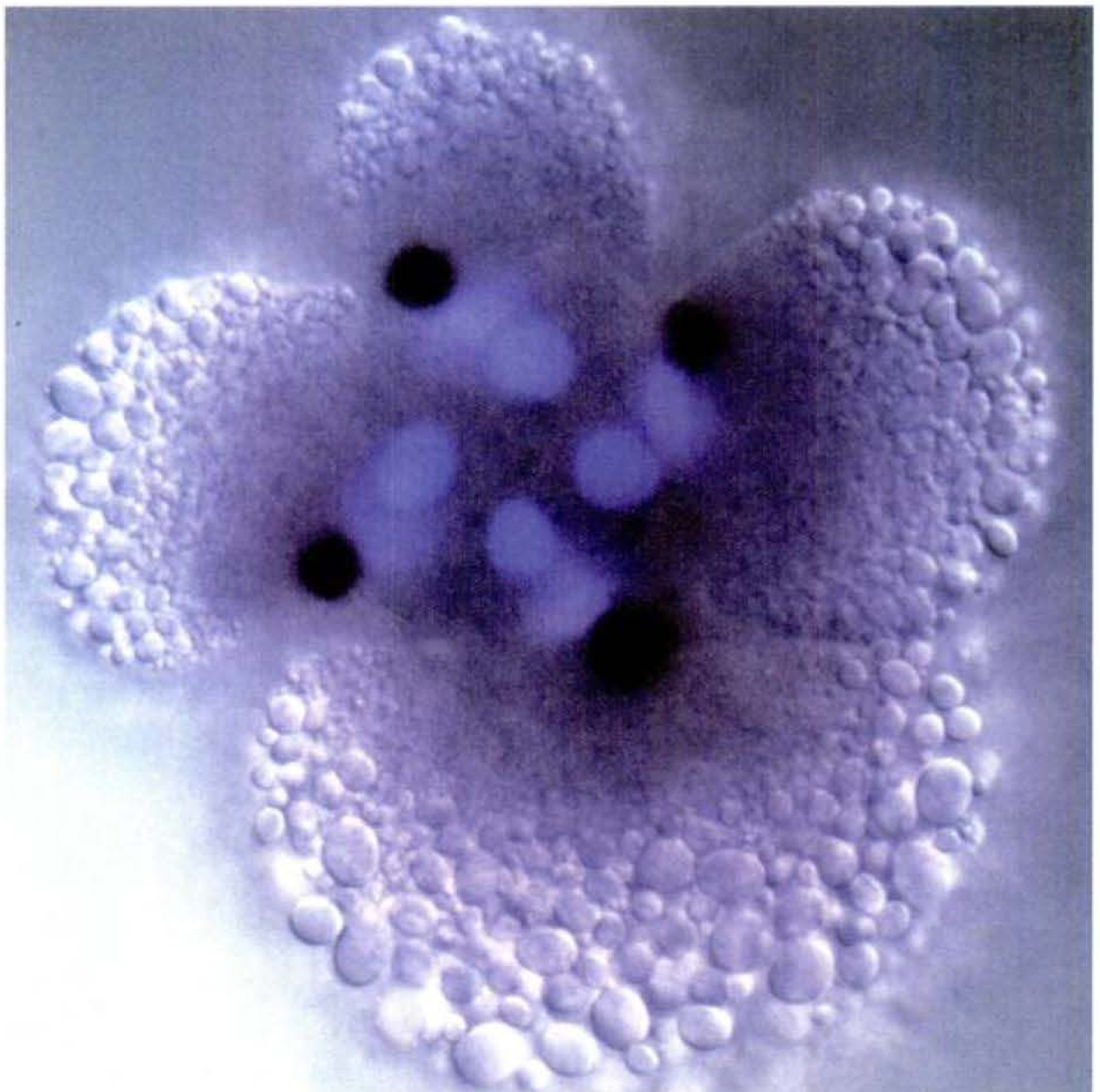
Wu, M. and 7 others. 2000. c-Kit triggers dual phosphorylation, which couples activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev. 14: 301-312

Yamada, T., S. L. Pfaff, T. Edlund and T. M. Jessell. 1993. Control of cell pattern in the neural tube: Motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell 73: 673-686.

Yoshida, H. and 7 others. 1998. Apafl is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell 94: 739-750.

Zygar, C. A., T. L. Cook, Jr, and R. M. Grainger. 1998. Gene activation during early stages of lens induction in Xenopus. Development 125: 3509-3519.

Parte II *Desarrollo embrionario temprano*



Durante el desarrollo temprano las proteínas son con frecuencia distribuidas de manera activa a células específicas. Cuando las cuatro células del embrión de caracol experimentan la división, el mRNA de la proteína Decapentaplegic llega a asociarse únicamente con uno de los dos centrosomas de cada célula. Este mensaje sigue a los centrosomas y llega a estar localizado en solamente cuatro de las ocho células. Por lo tanto, esta proteína es sintetizada únicamente en una parte del embrión (Figura 8-31 cortesía de L. Nagy.)

Capítulo 7 Fecundación: el comienzo de un nuevo organismo

Impulso, impulso, impulso
Siempre el impulso procreante del mundo.
De la oscuridad surgen los iguales opuestos,
Siempre la sustancia y el desarrollo, siempre el sexo,
Siempre un tejido de identidad, siempre lo distinto,
Siempre una generación de vida.
WALT WHITMAN (1855)

El objetivo final de todas las intrigas de amor, sean ellas cómicas o trágicas, es realmente de mayor importancia que todos los otros fines en la vida humana. Sobre qué es lo que da vueltas no es nada menos que la composición de la siguiente generación.
A. SCHOPENHAUER
(CITADO POR C. DARWIN, 1871)

LA FECUNDACIÓN ES UN PROCESO por el cual dos células sexuales (gametos) se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos padres. La fecundación lleva a cabo dos fines separados: la sexualidad (la combinación de genes derivados a partir de los dos padres) y la reproducción (la creación de un nuevo organismo). Por lo tanto, la primera función de la fecundación es transmitir los genes desde los padres a la descendencia, y la segunda es dar comienzo en el citoplasma de la célula huevo (cigoto) a aquellas reacciones que permiten que el desarrollo continúe.

Aunque los detalles de la fecundación varían entre las distintas especies, los acontecimientos de la concepción en general constan de cuatro eventos principales.

1. Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino*. En la mayoría parte de los casos, esto asegura que el espermatozoide y el gameto femenino sean de la misma especie.
2. Regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino. Solo un espermatozoide puede finalmente fecundar al gameto femenino. Esto es generalmente llevado a cabo al permitir que solo un espermatozoide entre al gameto femenino y se inhibe el ingreso de otros.
3. Fusión del material genético del espermatozoide y del gameto femenino.
4. Activación del metabolismo de la célula huevo o cigoto para dar comienzo al desarrollo.

---

* *Nota del traductor:* como se trata de una descripción general de los principales eventos de la fecundación que puede ser considerada para numerosas especies resulta inconveniente especificar en qué estadio se encuentra el gameto femenino a ser fecundado, debido a que como se verá más adelantes éste varía entre las distintas especies. Tampoco es oportuna la denominación de huevo ya que es un término demasiado genérico y que en las especies ovíparas representa algo más que un gameto femenino. Por último, se debe destacar que para algunos autores la denominación de óvulo corresponde a aquel gameto femenino que ha finalizado la meiosis II, por lo tanto no resulta oportuno utilizarlo, genéricamente debido a que quedarían excluidos de estos principios generales muchas especies cuyos gametos con capacidad fecundante no completan la meiosis II previamente al proceso de fecundación, sino que lo harán como consecuencia de ésta. Por otra parte otros autores prefieren denominar óvulo a todo gameto con capacidad fecundante, sin importar el estadio de desarrollo en el que se encuentra el gameto. En la presente traducción se eligió la opción que resulta más útil para brindar información que permita comprender en profundidad los procesos de desarrollo aquí descritos; por tal razón se especificó en cada caso el estadio de desarrollo del gameto a ser fecundado, por ejemplo, en el erizo de mar es el óvulo y en el ratón es el ovocito II, en los casos en los que no se especificó la especie y en los cuales el texto hacía referencia de un modo general a la fecundación, se optó por utilizar la denominación de gameto femenino.

Estructura de los gametos

Existe un complejo diálogo entre el espermatozoide y el gameto femenino. El gameto femenino activa el metabolismo del espermatozoide que es esencial para la fecundación, y el espermatozoide corresponde activando el metabolismo del gameto femenino necesario para dar comienzo al desarrollo. Pero antes de investigar estos aspectos de la fecundación, será necesario considerar las estructuras del espermatozoide y del gameto femenino –los dos tipos celulares especializados para la fecundación.

Espermatozoide

Es solo durante los últimos 125 años que ha sido conocido el papel del espermatozoide en la fecundación. Anton van Leeuwenhoek, el microscopista Holandés que codescubrió el espermatozoide en 1678, creyó en primer lugar que ellos eran animales parásitos que vivían en el semen (de ahí el termino *espermatozoide*, cuyo significado es "animales del esperma"). Él originalmente asumió que ellos no tenían nada que ver con la reproducción del organismo en el que fueron encontrados, pero más tarde comenzó a creer que cada espermatozoide contenía un embrión preformado. Leeuwenhoek (1685) escribió que los espermatozoides eran semillas (*esperma* y *semen* significan "semilla") y que la mujer simplemente proporcionaba el suelo nutritivo en el cual las semillas eran plantadas. Con esto, él regresaba a una noción de procreación promulgada por Aristóteles 2000 años antes. Intentó todo cuanto él pudo, Leeuwenhoek estuvo decepcionado continuamente en sus tentativas de encontrar embriones preformados dentro de los espermatozoides. Nicolás Hartsoeker, el otro co-descubridor del espermatozoide, dibujó un cuadro de lo que él esperaba encontrar: un humano preformado ("homúnculo") dentro del espermatozoide humano (fig. 7-1). Esta creencia de que el espermatozoide contenía el organismo embrionario entero nunca obtuvo mucha aceptación, debido a que esto implicaba un enorme desperdicio de vida potencial. La mayoría de los investigadores consideraban al espermatozoide como carente de importancia (véase Pinto-Correia 1997 para detalles de esta sorprendente historia).

SITIO WEB 7.1 **Leeuwenhoek y las imágenes de los homúnculos (Leeuwentock and images of homunculi).** Los eruditos en el año 1600 pensaban que el espermatozoide o el gameto femenino llevaban el rudimento del cuerpo adulto. Además, estas opiniones se volvieron deformadas por comentaristas contemporáneos e historiadores posteriores.

La primera evidencia sugiriendo la importancia del espermatozoide en la reproducción vino de una serie de experimentos realizados por Lazzaro Spallanzani a finales de 1700. Spallanzani demostró que el semen de sapo filtrado carente de espermatozoides no podía fecundar al gameto femenino (ovocito tipo II). Sin embargo, concluyó que el fluido viscoso retenido por el papel de filtro, y no el espermatozoide, era el agente responsable de la fecundación. Él, como muchos otros, creía que los "animales" espermáticos eran parásitos.

La combinación de mejores lentes para los microscopios y la teoría celular llevaron a una nueva apreciación de la función de los espermatozoides. En 1824, J. L. Prevost y J. B. Dumas afirmaron que los espermatozoides no eran parásitos, sino más bien los agentes activos de la fecundación. Ellos observaron la existencia universal del espermatozoide en los machos sexualmente maduros y su ausencia en individuos inmaduros y ancianos. Estas observaciones, asociadas con la conocida ausencia de espermatozoides en la mula estéril, les convencieron de que "existe una íntima relación entre su presencia en los órganos y la capacidad fecundante del animal." Propusieron que el espermatozoide ingresaba al gameto femenino y contribuía materialmente a la generación siguiente.

Estas afirmaciones fueron en gran parte despreciadas hasta la década de 1840, cuando A. von Kolliker describió la formación de los espermatozoides a partir de las células dentro de los testículos. Él puso en ridículo la idea de que el semen pudiese ser normal y a la vez ser el sustento para un número tan enorme de parásitos. Aún así, von Kolliker negó que hubiese cualquier contacto físico entre el espermatozoide y el gameto femenino. Creía que el espermatozoide excitaba el desarrollo del gameto femenino, tal como un imán comunica su presencia al hierro.

No fue hasta 1876 que Oscar Hertwig y Herman Fol demostraron de manera independiente que el espermatozoide entraba al gameto femenino y que se producía la unión de los dos núcleos celulares. Hertwig había estado buscando un organismo adecuado para observaciones microscópicas minuciosas, y encontró que el erizo de mar mediterráneo, *Toxopneustes lividus*, era perfecto. Este organismo no solo era común en toda la región y sexualmente maduro durante la mayor parte del año, sino que sus huevos (óvulos) eran fáciles de conseguir en grandes números y eran transparentes aún a grandes aumentos. Luego de mezclar suspensiones de espermatozoides y huevos (gameto femenino), Hertwig observó repetidamente a un espermatozoide ingresando a un óvulo y vio unirse a los dos núcleos. También observó que solo un espermatozoide ingresaba en cada óvulo, y que todos los núcleos del embrión eran derivados mitóticamente a partir del núcleo creado durante la fecundación. Fol llevó a cabo observaciones similares y expuso en detalle el mecanismo de ingreso del espermatozoide. La fecundación fue por fin reconocida como la unión del espermatozoide y el gameto femenino, y la unión de los gametos del erizo de mar sigue siendo uno de los ejemplos de fecundación mejor estudiados.

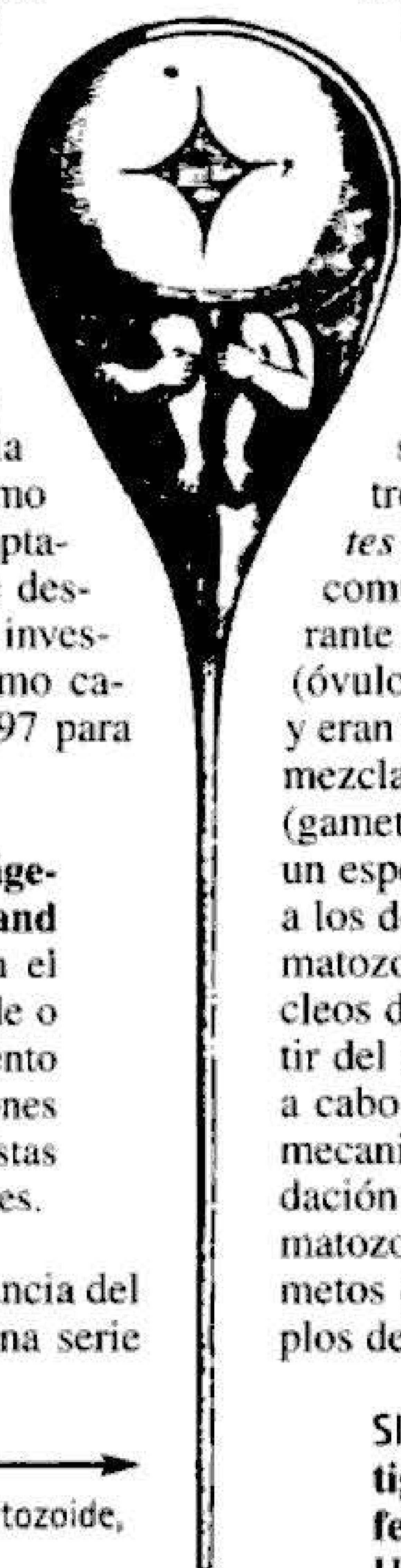


Fig. 7-1. El niño humano preformado en el espermatozoide, tal como lo representó Nicolás Hartsoeker (1694).

SITIO WEB 7.2 **Los orígenes de la investigación en fecundación (The origins of fertilization research).** Los estudios de Hertwig, Fol, Boveri y Auerbach investiga-

ron la fecundación integrando la citología con la genética. En estas investigaciones sobre fecundación fueron críticos los debates sobre la meiosis y la estructura nuclear.

Cada espermatozoide consiste en un núcleo haploide, un sistema de propulsión para trasladar el núcleo, y un saco de enzimas que le permiten al núcleo penetrar al gameto femenino. La mayor parte del citoplasma del espermatozoide es eliminada durante la maduración, dejando solo ciertas organelas que son modificadas para la función del espermatozoide (fig. 7-2). Durante el curso de la maduración del espermatozoide, el núcleo haploide se ha vuelto muy aerodinámico, y su DNA ha resultado fuertemente comprimido. Por delante de este núcleo haploide comprimido se localiza la **vesícula acrosómica, o acrosoma,** que es derivada del aparato de Golgi y que contiene enzimas que digieren proteínas y glúcidos complejos. Por lo tanto, ésta puede ser considerada una vesícula secretora modificada. Las enzimas almacenadas en el acrosoma son utilizadas para degradar y atravesar la cubierta externa del gameto femenino. En muchas especies, como en el erizo de mar, una región de moléculas de actina globular se localiza entre el núcleo y la vesícula acrosómica. Estas proteínas son utilizadas durante los estadios tempranos de la fecundación para extender desde el esperma-

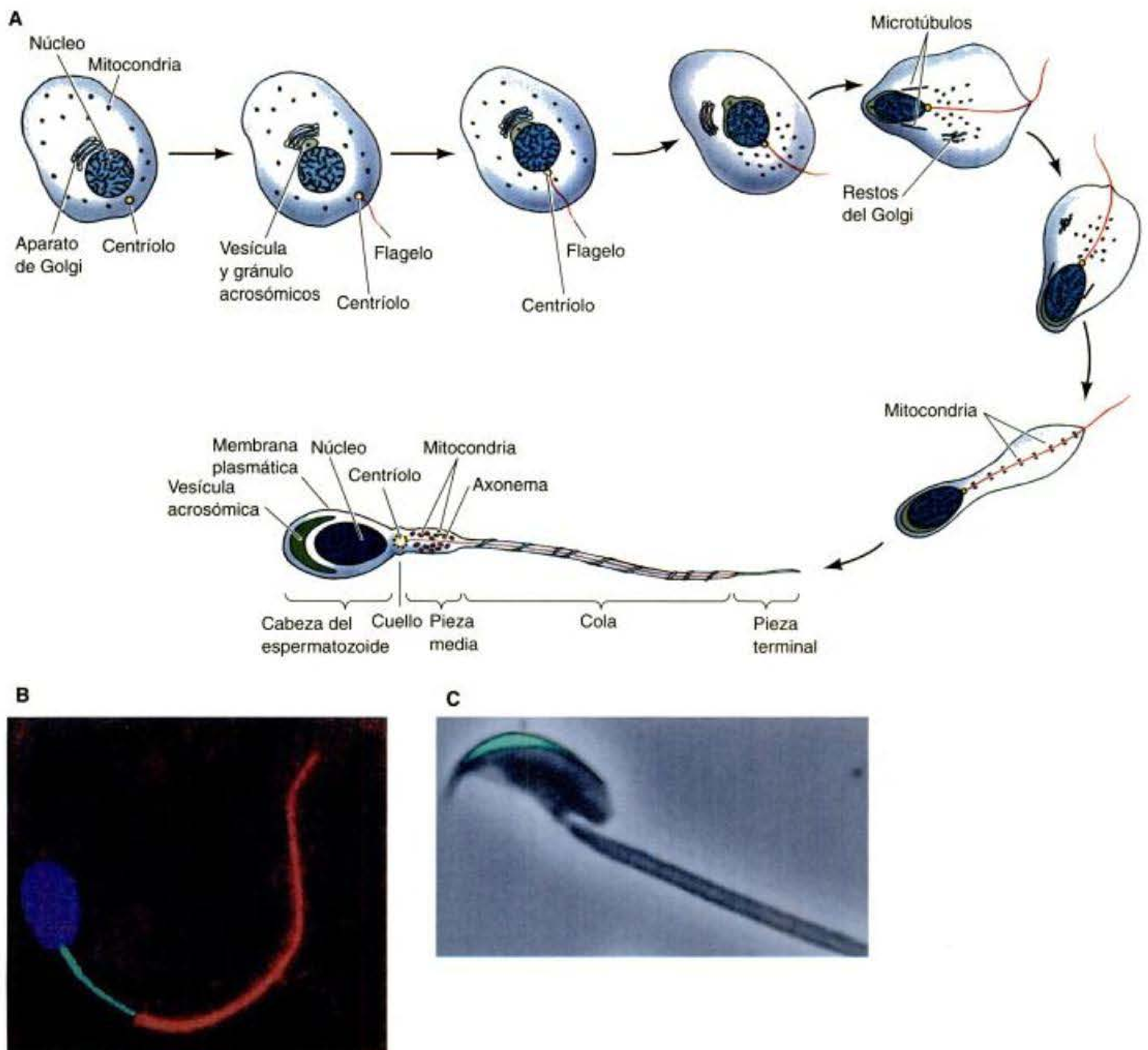


Fig. 7-2. Modificación de una célula germinal para formar un espermatozoide de mamíferos. **A.** El centríolo produce un largo flagelo en el que estará el extremo posterior del espermatozoide, y el aparato de Golgi forma la vesícula acrosómica en el futuro extremo anterior. Las mitocondrias (puntos) se reúnen en torno al flagelo cerca de la base del núcleo haploide y se incorporan a la pieza media del espermatozoide. El citoplasma restante es eliminado y el núcleo se condensa. El tamaño del espermatozoide maduro ha sido relativamente aumentado en relación a los otros estadios. **B.** Espermatozoide maduro de toro. El DNA está teñido de azul con DAPI; las mitocondrias están teñidas de verde, y la tubulina del flagelo está teñida de rojo. **C.** Acrosoma de un espermatozoide de ratón, teñido de verde por GFP. Una construcción en la cual el gen GFP fue combinado con el promotor de la proacrosina causando la acumulación de GFP en el acrosoma. (**A**, según Clermont y Leblond 1955; **B**, de Sutovsky y col. 1996; fotografía cortesía de G. Schatten; **C**, fotografía cortesía de K.-S. Kim y G. L. Gerton.)

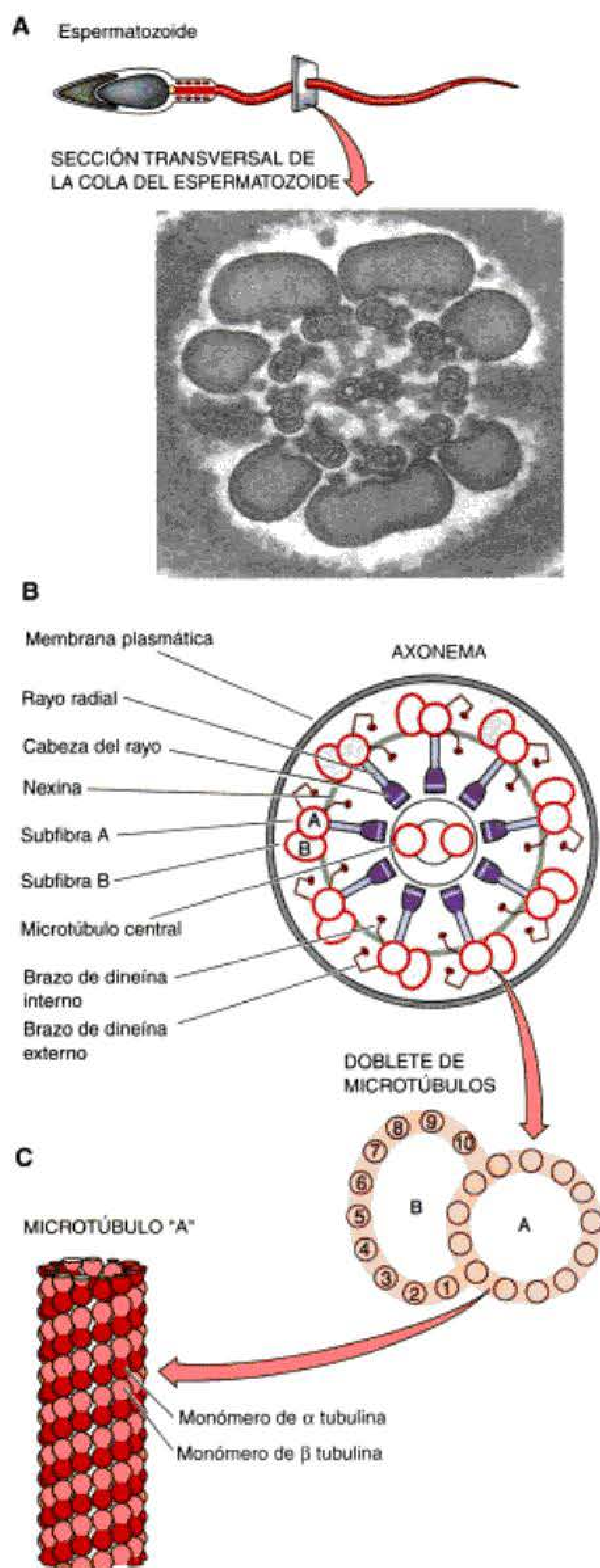


Fig. 7-3. Aparato motor del espermatozoide. **A.** Sección transversal del flagelo de un espermatozoide de mamífero que muestra el axonema central y las fibras externas. **B.** Diagrama interpretativo del axonema que muesta la organización "9+2" de los microtúbulos y de otros componentes del flagelo. El diagrama esquemático muestra la asociación de los protofilamentos de tubulina en un doblete de microtúbulos La primera parte ("A") del doblete es un microtúbulo normal compuesto por 13 protofilamentos. La segunda parte ("B") del doblete contiene solo 11 protofilamentos (ocasionalmente 10). Los brazos de dineína contienen la ATPasa que proporciona la energía para el movimiento flagelar. **C.** Modelo tridimensional de un microtúbulo "A". Las subunidades α y β de la tubulina son similares pero no idénticas. El microtúbulo puede cambiar de tamaño mediante la polimerización o la despolimerización de las subunidades de tubulina sobre ambos extremos. (A, fotografía cortesía de D. M. Phillips; B, según De Robertis y col. 1975 y Tilney y col. 1973.)

tozoide un **proceso o filamento acrosómico** con forma de dedo. En erizos de mar y en varias especies, el reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino involucra a moléculas localizadas sobre el proceso acrosómico. El acrosoma y el núcleo constituyen en conjunto la **cabeza** del espermatozoide.

Los medios por los cuales el espermatozoide es impulsado varían de acuerdo a cómo la especie se ha adaptado a las condiciones ambientales. En algunas especies (como el gusano cilíndrico parásito *Ascaris*), el espermatozoide viaja por el movimiento ameboide de las extensiones lamelipodiales de la membrana celular. Sin embargo, en la mayoría de las especies cada espermatozoide es capaz de viajar grandes distancias mediante el agitamiento de su **flagelo**. Los flagelos son estructuras complejas. La principal porción motora del flagelo es denominada **axonema.** Éste está formado por microtúbulos que emanan a partir del centríolo localizado en la base del núcleo del espermatozoide (figs. 7-2 y 7-3). El centro del axonema consiste en dos microtúbulos centrales rodeados por una hilera de nueve dobletes de microtúbulos. En realidad, solo un microtúbulo de cada doblete es completo, teniendo 13 protofilamentos; el otro tiene forma de C y posee tan solo 11 protofilamentos (fig. 7-3B). En la figura 7-3C se muestra un modelo tridimensional de un microtúbulo completo. Aquí se pueden ver los 13 protofilamentos interconectados que están formados exclusivamente por dímeros de la proteína **tubulina**.

Aunque la tubulina es la base de la estructura del flagelo, otras proteínas también son críticas para la función flagelar. La fuerza de impulso del espermatozoide es proporcionada por la **dineína,** una proteína adherida a los microtúbulos (fig. 7-3B). La dineína hidroliza moléculas de ATP y convierte la energía química liberada en energía mecánica que impulsa al espermatozoide. Esta energía permite el activo deslizamiento del doblete externo de microtúbulos, haciendo que el flagelo se doble (Ogawa y col. 1977; Shinyoji y col. 1998). La importancia de la dineína puede ser vista en individuos con el síndrome denominado la tríada de Kartagener. Estos individuos carecen de dineína en todas sus células ciliadas y flageladas, haciendo inmóviles a estas estructuras. Los varones con esta enfermedad son estériles (espermatozoides inmóviles), son susceptibles a infecciones bronquiales (cilios respiratorios inmóviles) y tienen un 50% de posibilidades de tener el corazón sobre el lado derecho del cuerpo (véase cap. 11; Afzelius 1976).

La histona H1 parece ser otra importante proteína flagelar. Esta proteína se encuentra por lo general dentro del núcleo, en donde pliega a la cromatina en grupos apretados. Sin embargo, Multigner y col. (1992) hallaron que la histona H1 también estabiliza a los microtúbulos del flagelo de modo tal que ellos no lleguen a desensamblarse.

La organización "9+2" de los microtúbulos con los brazos de dineína (fig. 7-2B) ha sido conservada en los axonemas a través de todos los reinos eucarióticos, lo que sugiere que esta organización es sumamente conveniente en la transmisión de energía para el movimiento. El ATP necesario para agitar el flagelo e impulsar al espermatozoide viene de los anillos de mitocondrias localizados en la pieza media del espermatozoide (véase fig. 7-2). En muchas especies (en particular en mamíferos), una capa de fibras densas está interpuesta entre la vaina de mitocondrias y el axonema. Esta capa de fibras forta-

lece la cola del espermatozoide. Debido a que el grosor de esta capa disminuye hacia el extremo, estas fibras probablemente impidan que la cabeza del espermatozoide sea azotada bruscamente a su alrededor. Por lo tanto, el espermatozoide experimentó amplias modificaciones para permitir el transporte de su núcleo hacia el gameto femenino.

En mamíferos, los espermatozoides liberados durante la eyaculación son capaces de moverse, pero todavía no cuentan con la capacidad para unirse y fecundar al gameto femenino. Estos estadios finales de la maduración del espermatozoide (denominados **capacitación**) no se producen hasta que los espermatozoides se encuentran dentro del tracto reproductor femenino por un cierto período.

El gameto femenino

Todo el material necesario para comenzar el crecimiento y el desarrollo debe estar almacenado en el gameto femenino maduro (el **óvulo**)*. Mientras que el espermatozoide ha eliminado la mayor parte de su citoplasma, el gameto femenino en desarrollo (denominado **ovocito** antes de alcanzar el estadio de meiosis en el que es fecundado) no solo conserva el material que posee, sino que está implicado activamente en acumular más. Las divisiones meióticas que forman el ovocito conservan su citoplasma (en lugar de dar la mitad de éste; véase fig. 19-22), y el ovocito sintetiza o absorbe proteínas, como las del vitelo, que actúan como reservas nutritivas para el embrión en desarrollo. Por lo tanto, los huevos de las aves (gameto femenino maduro†) son células individuales enormes, que han aumentado su volumen acumulando vitelo. Aún los gametos femeninos con relativamente escaso vitelo son grandes comparados con el espermatozoide. El volumen del óvulo del erizo de mar (fig. 7-4) es cercano a 200 picolitros (2×10^{-4} mm^3), más de 10.000 veces el volumen del espermatozoide. De este modo, mientras el espermatozoide y el gameto femenino maduro tienen iguales componentes nucleares haploides, el gameto femenino también acumula un notable almacén citoplásmico durante su maduración. Este tesoro citoplásmico escondido incluye lo siguiente:‡

- **Proteínas**. Pasará mucho tiempo antes de que el embrión sea capaz de alimentarse por sí mismo o hasta que pueda obtener el alimento de su madre. Las células embrionarias tempranas necesitan un suministro de energía y aminoácidos. En muchas especies, esto es llevado a cabo mediante la acumulación de proteínas vitelinas en el gameto femenino. Muchas de estas proteínas del vitelo son producidas en otros órganos (hígado, cuerpos grasos) y viajan a través de la sangre materna hasta el gameto femenino.
- **Ribosomas y tRNA**. El embrión temprano necesita producir muchas de sus propias proteínas, y en algunas especies, hay una explosión de síntesis de proteínas poco después de la fecundación. La síntesis de proteínas es llevada a cabo por los ribosomas y el tRNA, que existen en la célula huevo o cigoto. El gameto femenino en desarrollo tiene mecanismos especiales para sintetizar ribosomas; algunos ovocitos de anfibio producen tanto como 10^{12} ribosomas durante su profase meiótica.
- **RNA mensajero**. En la mayoría de los organismos, las instrucciones para la producción de proteínas durante el desarrollo temprano están almacendas en el ovocito. Se estima que los óvulos (ha finalizado la meiosis II) del erizo de mar contienen miles de tipos diferentes de mRNA. Sin embargo, este mRNA se mantiene inactivo hasta después de la fecundación (véase cap. 5).
- **Factores morfogenéticos**. Las moléculas que dirigen la diferenciación de las células hacia ciertos tipos celulares están presentes en el huevo (gameto femenino). En muchas especies, ellas están localizadas en diferentes regiones del huevo (gameto femenino) y llegan a ser segregadas en diferentes células durante la segmentación (véase cap. 8).
- **Químicos protectores**. El embrión no puede correr alejándose de los depredadores o moverse a un am-

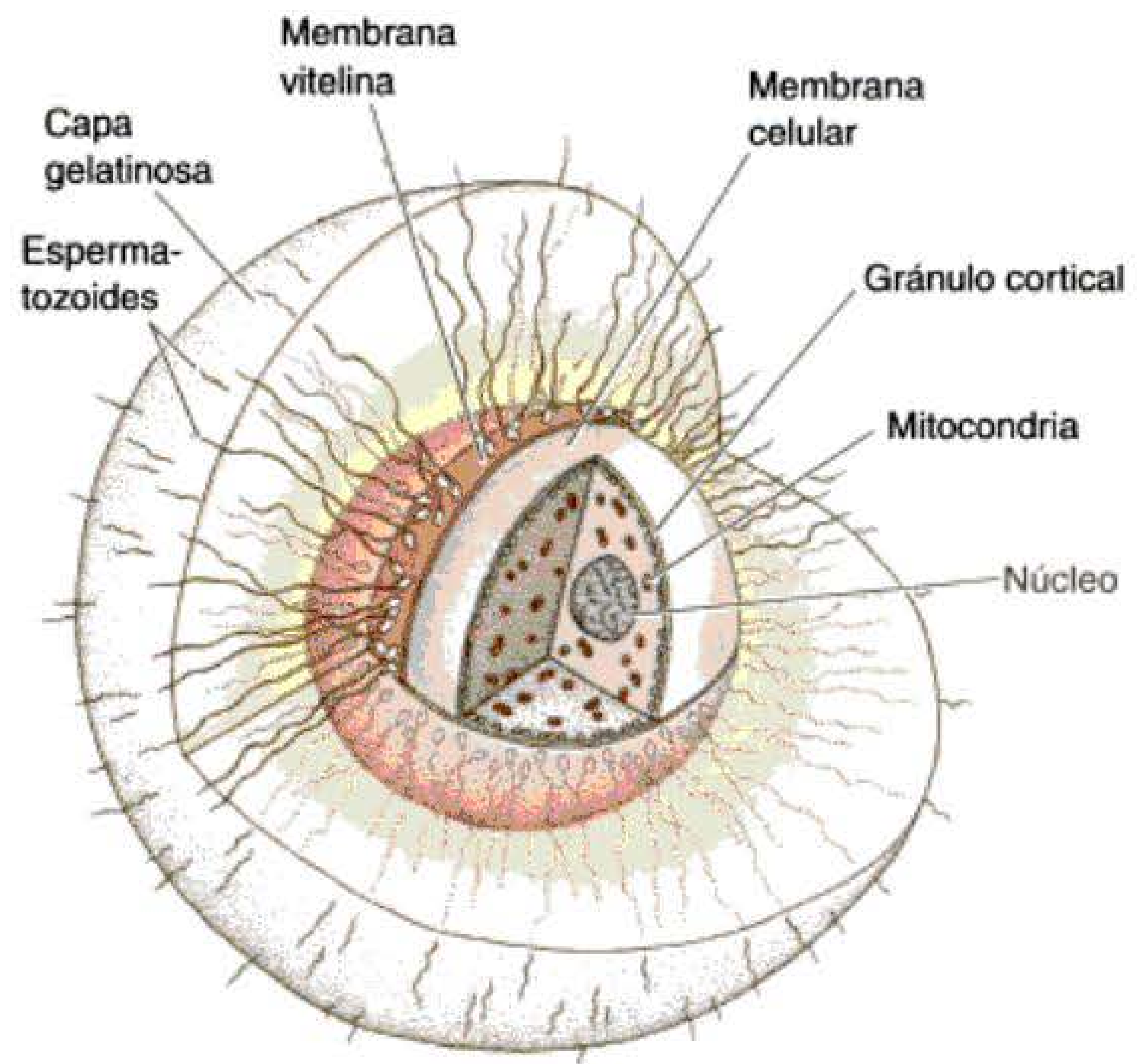


Fig. 7-4. Estructura del óvulo del erizo de mar en la fecundación. El dibujo muestra los tamaños relativos del óvulo y de los espermatozoides. (Según Epel 1977.)

* *Nota del traductor:* numerosos autores definen al óvulo como al gameto femenino con capacidad fecundante que ha finalizado la meiosis II, pero en numerosas especies la fecundación se lleva a cabo entre un espermatozoide y un gameto femenino con capacidad fecundante que no han finalizado la meiosis II. En el texto se utiliza la denominación de óvulo para los casos en los que han finalizado la meiosis II y en los restantes se especificará el estado correspondiente o se lo denominará gameto femenino.

† *Nota del traductor:* los huevos de las aves u otros organismos inicialmente se corresponden con el gameto femenino con capacidad fecundante, pero posteriormente constituyen la estructura dentro de la cual transcurre el desarrollo embrionario. Se debe tener en cuenta esta diferencia para no confundir el sentido de las definiciones.

‡ El contenido del huevo (gameto femenino) varía mucho de una especie a la otra. La síntesis y localización de estos materiales será tratada en el capítulo 19, cuando se discuta la diferenciación de las células germinales.

biente seguro, de modo tal que debe venir equipado para luchar contra estas amenazas. Muchos huevos (gametos femeninos) contienen filtros ultravioletas y las enzimas que reparan el DNA que los protege de la luz del sol. Algunos huevos (gametos femeninos) contienen moléculas que potenciales depredadores encontrarían desagradables, e incluso el vitelo de las aves contiene anticuerpos.

> SITIO WEB 7.3 **El huevo (gameto femenino) y sus ambientes (The egg and its enviromment).** El laboratorio no es el sitio en donde son hallados la mayoría de los huevos. Los huevos han evolucionado extraordinarias vías para autoprotegerse en ambiente particulares.

Dentro de este citoplasma de enorme volumen reside un gran núcleo. En algunas especies (p. ej., erizos de mar), el núcleo es realmente haploide en el momento de la fecundación. En otras especies (incluidos muchos gusanos y la mayoría de los mamíferos), los núcleos de los gametos femeninos maduros son todavía diploides –el espermatozoide ingresa antes que sea completada la división meiótica. En la figura 7-5 se ilustra el estadio del gameto femenino al momento de la entrada del espermatozoide en diferentes especies.

La **membrana celular** rodea al citoplasma del gameto femenino. Esta membrana debe regular el flujo de ciertos iones durante la fecundación y debe ser capaz de fusionarse con la membrana celular del espermatozoide. Por fuera de la membrana celular se encuentra una membrana formada por un material fibroso alrededor del huevo y que con frecuencia está involucrada en el reconocimiento espermatozoide-gameto femenino (Correia y Carroll 1997). En invertebrados, esta estructura es usualmente denominada **membrana o envoltura vitelina** (fig. 7-6). La membrana vitelina contiene varias glucoproteínas diferentes. Ésta es complementada por extensiones de las glucoproteínas de membrana desde la membrana celular y por "postes" vitelinos proteináceos que adhieren la membrana vitelina a la membrana (Mozingo y Chandler 1991). La membrana vitelina es esencial para la unión específica de especie del espermatozoide. En mamíferos, la membrana vitelina es una matriz extracelular separada y gruesa denominada **zona pelúcida.** El ovocito II de mamíferos también está rodeado por una capa de células denominada el **cúmulo** (fig. 7-7), que es producido por las células foliculares del ovario que estaban nutriendo al gameto femenino al momento de su liberación del ovario. Los espermatozoides de mamíferos tienen que atravesar estas células para fecundar al ovocito II. La capa más interna de las células del cúmulo, inmediatamente adyacente a la zona pelúcida, es denominada la **corona radiada**.

Inmediatamente por debajo de la membrana celular del gameto femenino se encuentra un delgado armazón (alrededor de 5 μm) de citoplasma similar al gel denominado **córtex**. El citoplasma en esta región es más resistente que el citoplasma interno y contiene elevadas concentraciones de actina globular. Durante la fecundación, estas moléculas de actina se polimerizan para formar largos cables de actina conocidos como **microfilamentos.** Los microfilamentos son necesarios para la división celular, y ellos también son utilizados para extender la superficie celular del gameto femenino a modo de pequeñas proyecciones denominadas **microvellosidades,** que puede ayudar al ingreso del espermatozoide a la célula (véase fig. 7-6B; además véase fig. 7-19).

Además dentro del córtex se encuentran los **gránulos corticales** (véanse figs. 7-4 y 7-6B). Estas estructuras unidas a la membrana, que son homólogas a la vesícula acrosómica del espermatozoide, son organelas derivadas del Golgi que contienen enzimas proteolíticas. Sin em-

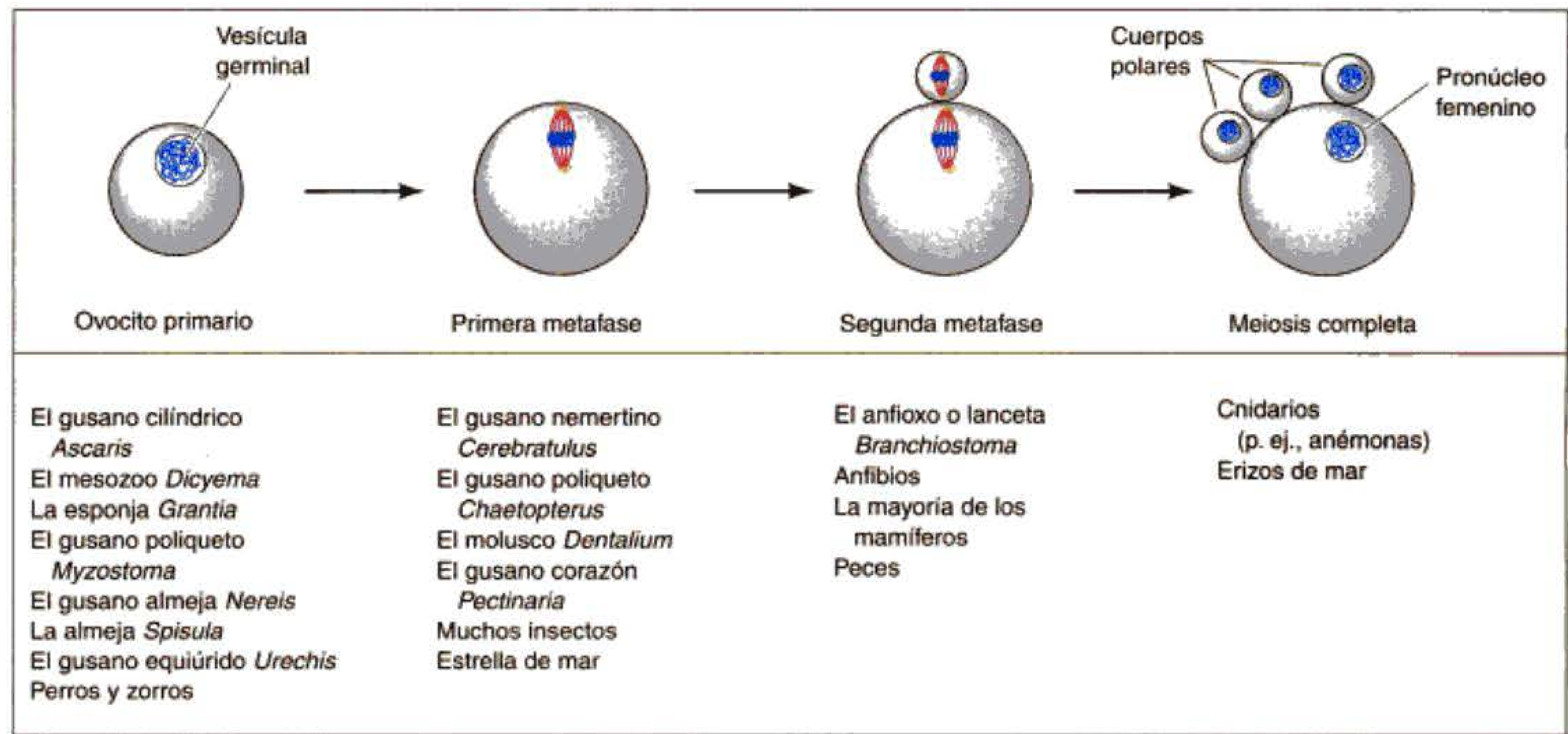


Fig. 7-5. Estadios de la maduración del gameto femenino en el momento del ingreso del espermatozoide en las diferentes especies animales. Vesícula germinal es el nombre que se le da al núcleo diploide de gran tamaño del ovocito primario. Se ven los cuerpos polares como células más pequeñas. (Según Austin 1965.)

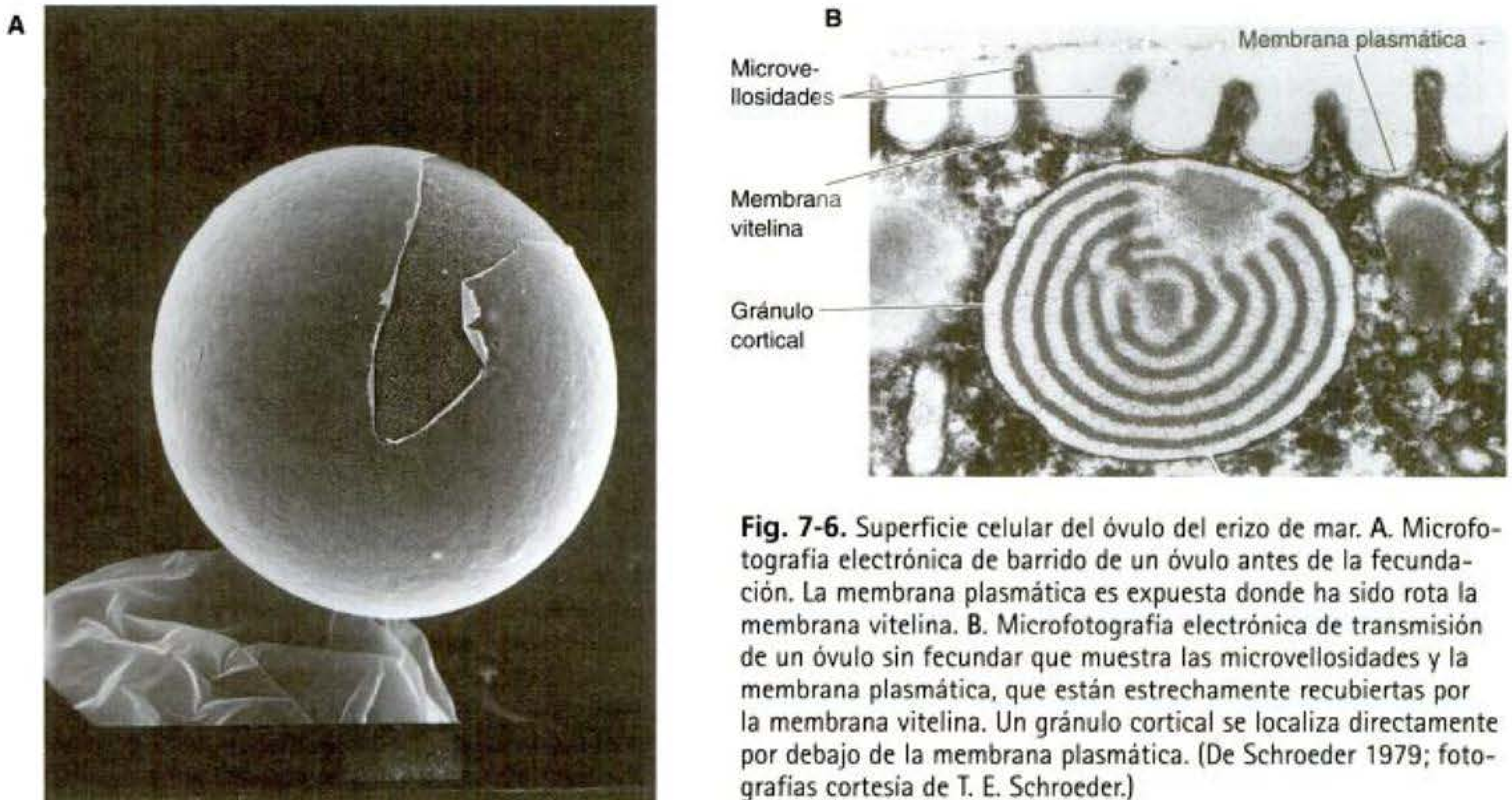


Fig. 7-6. Superficie celular del óvulo del erizo de mar. **A.** Microfotografía electrónica de barrido de un óvulo antes de la fecundación. La membrana plasmática es expuesta donde ha sido rota la membrana vitelina. **B.** Microfotografía electrónica de transmisión de un óvulo sin fecundar que muestra las microvellosidades y la membrana plasmática, que están estrechamente recubiertas por la membrana vitelina. Un gránulo cortical se localiza directamente por debajo de la membrana plasmática. (De Schroeder 1979; fotografías cortesía de T. E. Schroeder.)

bargo, mientras que los espermatozoides contienen tan solo una vesícula acrosómica, cada óvulo de erizo de mar contiene aproximadamente 15.000 gránulos corticales. Por otra parte, además de enzimas digestivas, los gránulos corticales contienen mucopolisacáridos, glucoproteínas adhesivas y proteína hialina. Las enzimas y los mucopolisacáridos evitan la entrada de cualquier espermatozoide adicional al gameto femenino luego que el primer espermatozoide ha entrado, y las glucoproteínas adhesivas y la hialina rodean al embrión temprano y proporcionan soporte para el estadio de segmentación de las blastómeras.

Muchos tipos de gametos femeninos también tienen una **capa gelatinosa** por fuera de la membrana vitelina (véase fig. 7-4). Esta malla glucoproteica puede tener numerosas funciones, pero con mayor frecuencia es utilizada para atraer o activar al espermatozoide. El gameto femenino, entonces, es una célula especializada para recibir espermatozoides y dar inicio al desarrollo.

VADE MECUM[2]. **Gametogénesis (Gametogenesis).** Secciones teñidas del testículo o del ovario ilustran los procesos de gametogénesis, la aerodinamización del espermatozoide en desarrollo, y el crecimiento notable del gameto femenino cuando almacena sustancias nutritivas para su largo viaje. Podrá ver esto en películas y fotografías marcadas que lo llevarán por cada etapa en profundidad dentro de la gónada de mamíferos.
[Hacer clic sobre Gametogenesis]

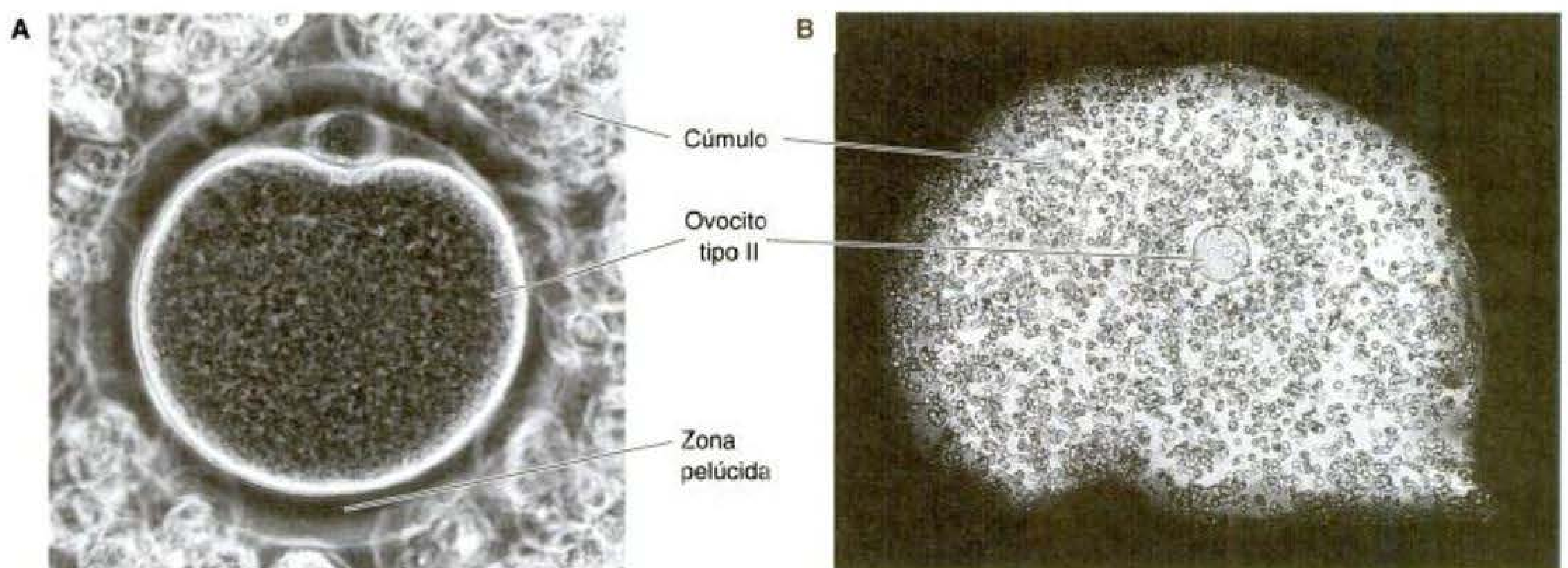


Fig. 7-7. Ovocitos tipo II de hámster inmediatamente antes de la fecundación. **A.** El ovocito II de hámster, o huevo, está encerrado en la zona pelúcida. Este, a su vez, está rodeado por las células del cúmulo. También es visible dentro de la zona pelúcida una célula del cuerpo polar, producida durante la meiosis. **B.** A bajos aumentos, se muestra un ovocito de ratón rodeado por el cúmulo. Las partículas de carbón coloidal (tinta India) son excluidas por la matriz de hialurónico. (Fotografías cortesía de R. Yanagimachi.)

Reconocimiento del gameto femenino y del espermatozoide

La interacción entre el espermatozoide y el gameto femenino avanza según cinco pasos básicos (fig. 7-8; Vacquier 1998):

1. La quimioatracción del espermatozoide hacia el gameto femenino por moléculas solubles secretadas por el gameto femenino.
2. La exocitosis de la vesícula acrosómica para liberar sus enzimas.
3. La unión del espermatozoide a la membrana o envoltura extracelular (capa vitelina o zona pelúcida) del gameto femenino.
4. El pasaje del espermatozoide a través de esta envoltura extracelular.
5. Fusión de las membranas del gameto femenino y del espermatozoide.

A veces los pasos 2 y 3 son invertidos (como en la fecundación de mamíferos), y el espermatozoide se une al gameto femenino antes de la liberación del contenido del acrosoma. Después de que estos cinco pasos son llevados a cabo, los núcleos del espermatozoide haploide y del gameto femenino pueden encontrarse y dar comienzo a las reacciones que inician el desarrollo.

En muchas especies, el encuentro del espermatozoide y del gameto femenino no es un asunto simple. Muchos organismos marinos liberan sus gametos en el ambiente. Este ambiente puede ser una pequeña charca de la marea o tan grande como un océano. Además, este ambiente es compartido con otras especies que pueden liberar sus células sexuales al mismo tiempo. Estos organismos se enfrentan a dos problemas. ¿cómo pueden encontrarse el espermatozoide y el gameto femenino en una concentración tan diluida? y ¿cómo se puede evitar que el espermatozoide trate de fecundar gametos femeninos de otras especies? Han evolucionado dos mecanismos principales para resolver estos problemas: atracción específica de especie de los espermatozoides y activación específica de especie de los espermatozoides.

Atracción de los espermatozoides: acción a distancia

La atracción específica de especie de los espermatozoides ha sido documentada en numerosas especies, incluidos los cnidarios, moluscos, equindermos y urocordados (Miller 1985; Yoshida y col. 1993). En muchas especies, los espermatozoides son atraídos hacia el gameto femenino de sus especies mediante quimiotaxis –esto es, al seguir un gradiente de un químico secretado por el gameto femenino. En 1978, Miller demostró que el gameto femenino del cnidario *Orthopyxis caliculata* no secreta solo un factor quí-

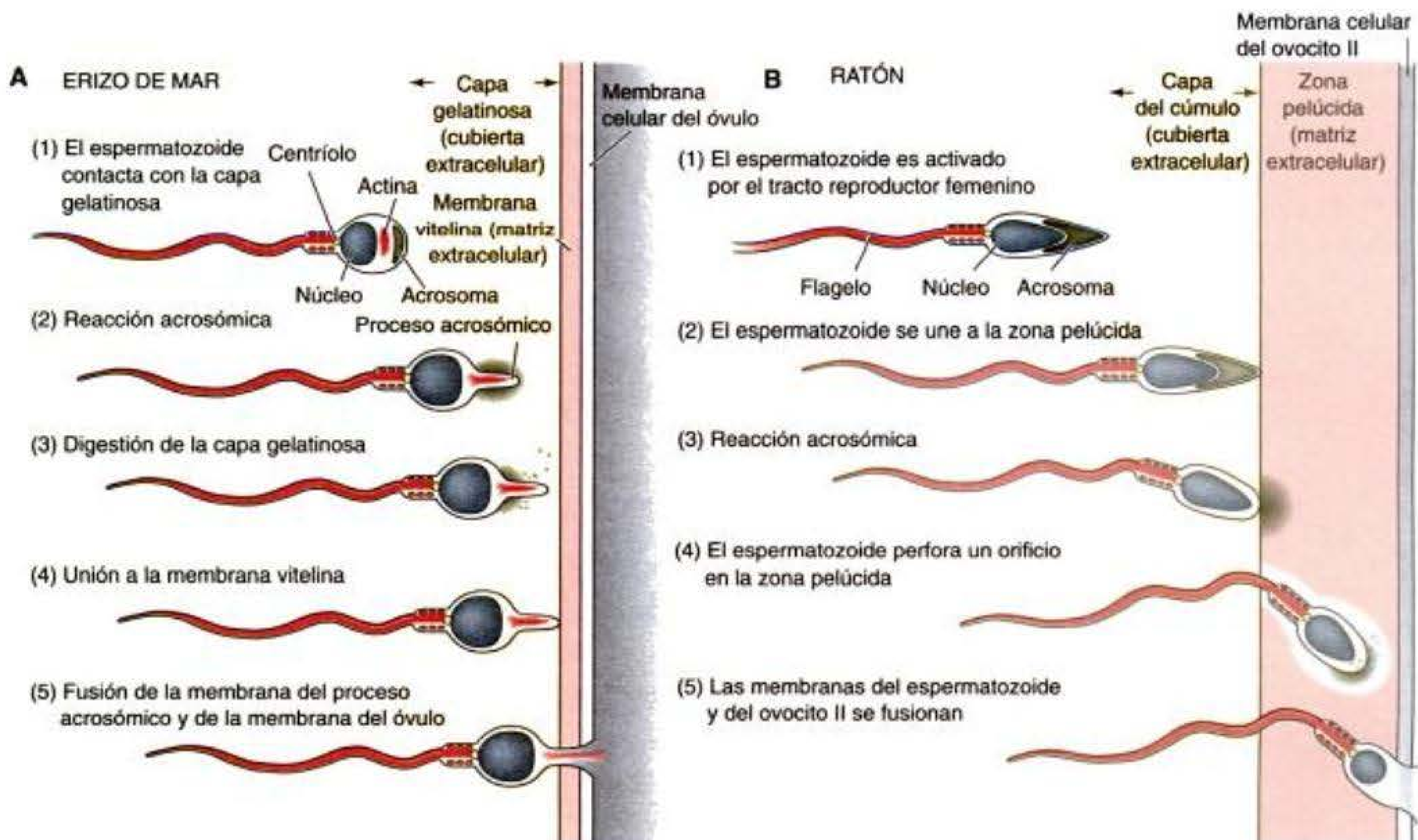


Fig. 7-8. Resumen de los acontecimientos que llevan a la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del gameto femenino en **A** el erizo de mar y **B** el ratón. **A.** La fecundación en el erizo de mar es externa. (1) El espermatozoide es atraído quimiotácticamente y activado por el óvulo. (2, 3) El contacto con la capa gelatinosa del óvulo dispara la reacción acrosómica, permitiendo la formación del proceso acrosómico y la liberación de enzimas proteolíticas. (4) El espermatozoide se adhiere a la membrana vitelina y perfora un orificio en ésta. (5) El espermatozoide se adhiere a la membrana plasmática del óvulo y se fusiona con ésta. A partir de este momento el pronúcleo del espermatozoide puede ingresar al citoplasma del óvulo. **B.** La fecundación en mamíferos es interna. (1) El contenido del tracto reproductor femenino capacita, atrae y activa al espermatozoide. (2) El espermatozoide con el acrosoma intacto se une a la zona pelúcida, que es más gruesa que la membrana vitelina de los erizos de mar. (3) La reacción acrosómica se produce sobre la zona pelúcida. (4) El espermatozoide digiere un orificio en la zona pelúcida. (5) El espermatozoide se adhiere al ovocito II, y sus membranas plasmáticas se fusionan.

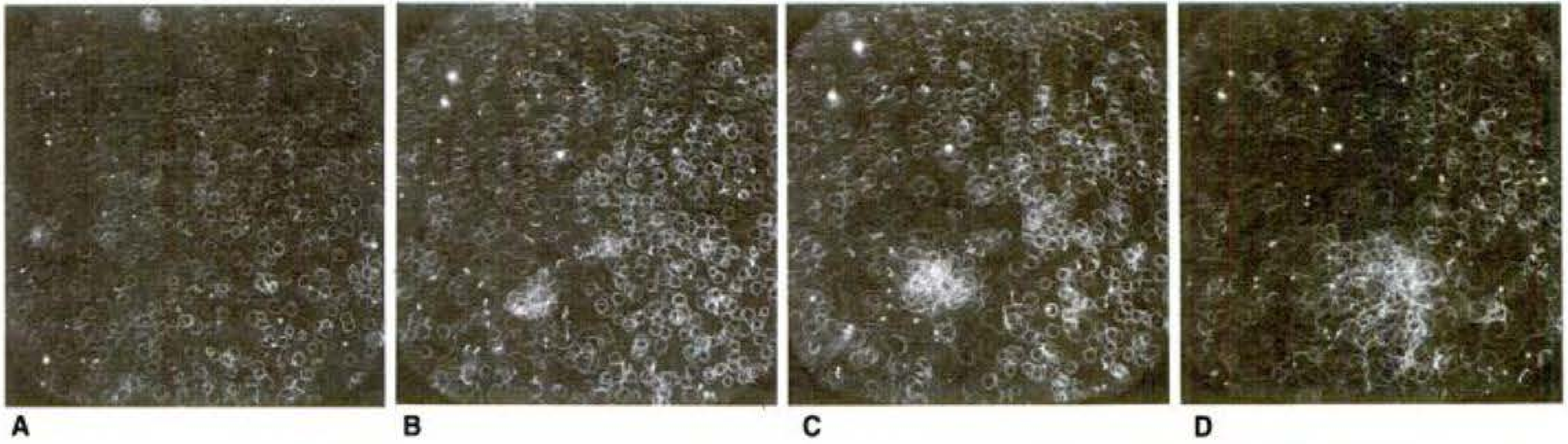


Fig. 7-9. Quimiotaxis del espermatozoide en el erizo de mar, *Arbacia punctulata*. Se inyecta un nanolitro de una solución 10-n*M* de resact en una gota de 20-μL de una suspensión de espermatozoides. Está indicada la posición de la micropipeta (líneas blancas). A. Una exposición fotográfica a 1-segundo muestra a espermatozoides nadando en círculos estrechos antes del agregado de resact. B-D. Una exposición semejante de 1-segundo muestra la migración de los espermatozoides hacia el centro del gradiente de resact a los 20, 40 y 90 segundos después de la inyección. (De Ward y col. 1985; fotografías cortesía de V. D. Vacquier.)

mico, sino que además regula el tiempo de su liberación. Ovocitos en varios estadios de desarrollo de su maduración fueron fijados sobre portaobjetos de microscopio, y los espermatozoides fueron liberados a cierta distancia del gameto femenino. Miller encontró que cuando los espermatozoides eran agregados al ovocito que todavía no había completado su segunda división meiótica, no había atracción del espermatozoide hacia el gameto femenino. Sin embargo, luego de haber finalizado la segunda división meiótica y el óvulo estaba listo para ser fecundado, los espermatozoides migraban hacia ellos. Por lo tanto, estos ovocitos no solo controlan el tipo de espermatozoide que atraen, sino además el momento en el que los atraen.

Los mecanismos de la quimiotaxis difieren entre especies (véase Metz 1978; Ward y Kopf 1993). Una molécula quimiotáctica, un péptido de 14 aminoácidos denominado **resact**, ha sido aislada de la capa gelatinosa del óvulo del erizo de mar *Arbacia punctulata* (Ward y col. 1985). Resact se difunde fácilmente en agua de mar y tiene un profundo efecto a muy bajas concentraciones cuando es agregada a una suspensión de espermatozoides de *Arbacia* (fig. 7-9). Cuando una gota de agua de mar conteniendo espermatozoides de *Arbacia* es colocada sobre un portaobjetos de microscopio, los espermatozoides por lo general nadan en círculos de cerca de 50 μm de diámetro. Unos segundos después que una pequeña cantidad de resact es inyectada en la gota, los espermatozoides migran a la región de inyección y se agrupan allí. Como resact continúa difundiendo a partir del área de inyección, son reclutados más espermatozoides en el grupo en crecimiento. Resact es específico para *A. punctulata* y no atrae a espermatozoides de otras especies. Los esperma-

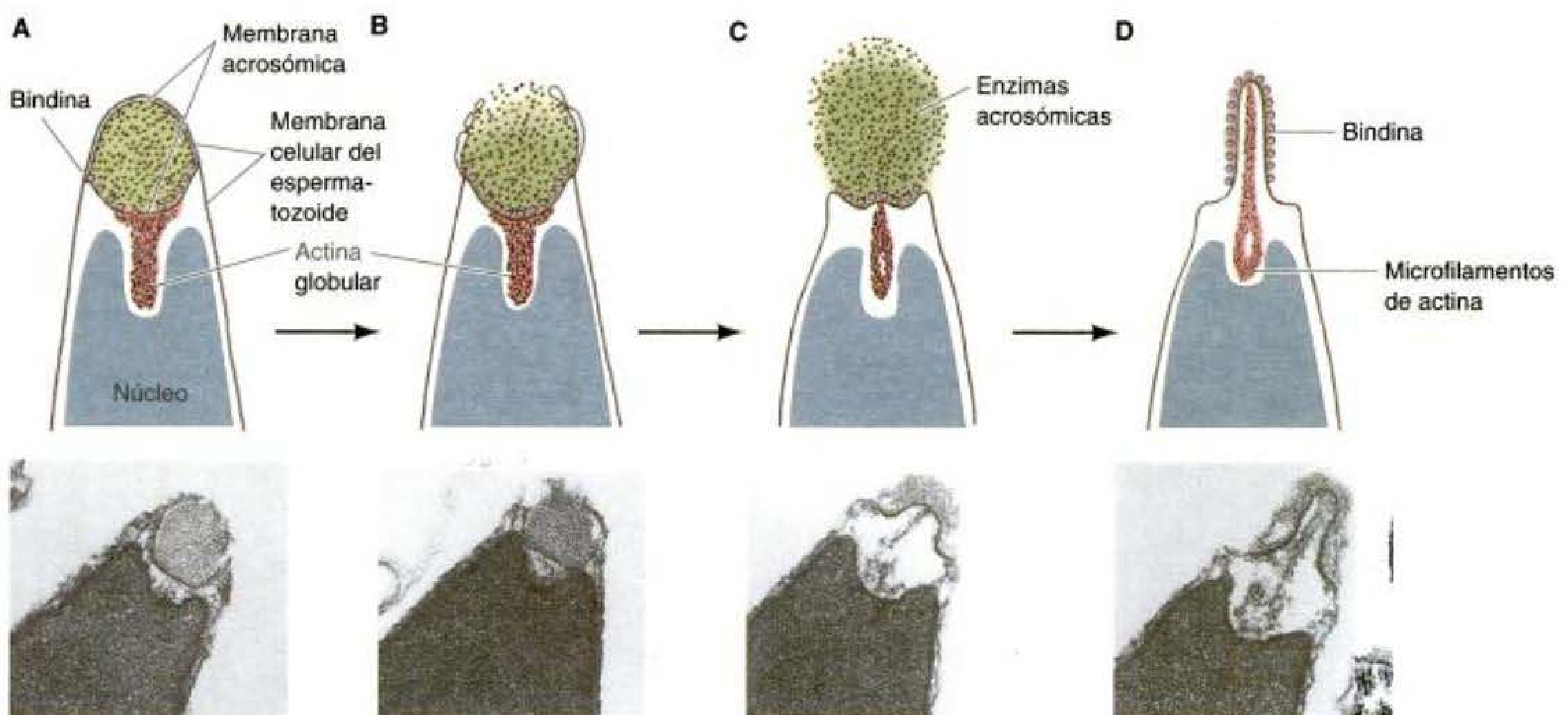


Fig. 7-10. Reacción acrosómica en el espermatozoide del erizo de mar. A-C. La porción de la membrana acrosómica localizada directamente por debajo de la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática para liberar el contenido de la vesícula acrosómica. D. Se ensamblan las moléculas de actina para producir microfilamentos, extendiendo el proceso acrosómico hacia fuera. Debajo de los diagramas se muestran fotografías reales de la reacción acrosómica en el espermatozoide del erizo de mar. (Según Summers y Hylander 1974; fotografías cortesía de G. L. Decker y W. J. Lennarz.)

tozoides de *A. punctulata* tienen receptores en sus membranas celulares que unen resact (Ramarao y Garbers 1985; Bentley y col. 1986) y pueden nadar hacia un gradiente de concentración de este compuesto hasta que alcancen al gameto femenino.

Resact también actúa como un **péptido activador de espermatozoides.** Los péptidos activadores de espermatozoides provocan incrementos espectaculares e inmediatos en la respiración mitocondrial y la movilidad de los espermatozoides (Tombes y Shapiro 1985; Hardy y col. 1994). El receptor del espermatozoide para resact es una proteína de transmembrana, y cuando ésta une resact sobre el lado extracelular, un cambio conformacional sobre el lado citoplasmático estimula la actividad enzimática del receptor. Esto activa el aparato mitocondrial de generación de ATP así como la ATPasa de dineína que estimula el movimiento flagelar en el espermatozoide (Shimomura y col. 1986; Cook y Babcock 1993).

La reacción acrosómica en el erizo de mar

Una segunda interacción entre el espermatozoide y el gameto femenino es la **reacción acrosómica.** En la mayoría de los invertebrados marinos, la reacción acrosómica tiene dos componentes: la fusión de la vesícula acrosómica con la membrana celular del espermatozoide (una exocitosis que resulta en la liberación del contenido de la vesícula acrosómica) y la extensión del proceso acrosómico (Colwin y Colwin 1963). La reacción acrosómica en los erizos de mar es iniciada por el contacto de los espermatozoides con la capa gelatinosa del óvulo. Este contacto provoca la exocitosis de la vesícula acrosómica del espermatozoide y la liberación de enzimas proteolíticas que pueden digerir un sendero a través de la cubierta de gelatina de la superficie del óvulo (Dan 1967; Franklin 1970, Levine y col. 1978). La secuencia de estos eventos es explicada en la figura 7-10.

En los erizos de mar, la reacción acrosómica es iniciada mediante las interacciones de la membrana celular del espermatozoide con al menos tres compuestos de la capa gelatinosa del óvulo. Estos compuestos se unen a receptores específicos localizados sobre la membrana celular del espermatozoide que se encuentra directamente por arriba de la vesícula acrosómica. Esta unión abre canales iónicos de calcio en la membrana celular, permitiendo el ingreso de calcio a la cabeza del espermatozoide (Schackmann y Shapiro 1981; Alves y col. 1997; Hirohashi y Vacquier 2002a). La exocitosis de la vesícula acrosómica es causada por la fusión de la membrana acrosómica mediada por calcio con la membrana celular del espermatozoide adyacente (figs. 7-10 y 7-11). Los factores de la capa gelatinosa del óvulo que inician la reacción acrosómica en los erizos de mar son a menudo altamente específicos para cada especie, y los hidratos de carbono de la capa gelatinosa del huevo de otras especies no pueden activar la reacción acrosómica aún entre especies estrechamente relacionadas (Hirohashi y Vacquier 2002b; Hirohashi y col. 2002).* Por lo tanto, la activación de la reacción acrosómica constituye una barrera para que se produzcan fecundaciones entre especies diferentes (y por lo tanto inviables) (Summers y Hylander 1975; Vilela-Silva y col. 2002).

La segunda parte de la reacción acrosómica involucra la extensión del proceso acrosómico (véase fig. 7-10). Esta protuberancia se origina a partir de la polimerización de moléculas de actina globular en filamentos de actina (Tilney y col. 1978). Se piensa que el influjo de iones de calcio (Ca) activa a la proteína RhoB, localizada en la región acrosómica y en la pieza media del espermatozoide del erizo de mar (Castellano y col. 1997). Esta proteína que se une a GTP ayuda a organizar el citoesqueleto de actina en muchos tipos de células, y se piensa que es activa en la polimerización de la actina para producir el proceso acrosómico.

* Tales reacciones exocitóticas se observan en la liberación de insulina desde las células pancreáticas y en la liberación de neurotransmisores a partir de los terminales sinápticos. En todos los casos, hay una fusión mediada por calcio entre la vesícula secretoria y la membrana celular. En efecto, las semejanzas entre la exocitosis de la vesícula acrosómica y la exocitosis de la vesícula sináptica pueden ser en realidad bastante profundas. Los estudios sobre las reacciones acrosómicas en erizos de mar y en mamíferos (Florman y col. 1992; González-Martínez y col. 1992) sugieren que cuando los receptores para ligandos que activan al espermatozoide unen a estas moléculas, provocan una despolarización de la membrana que abriría los canales iónicos de calcio de un modo semejante al de la transmisión sináptica. Las proteínas que acoplan los gránulos corticales del gameto femenino a la membrana celular también parecen ser homólogas a las utilizadas en la terminal del axón (Bi y col. 1995).

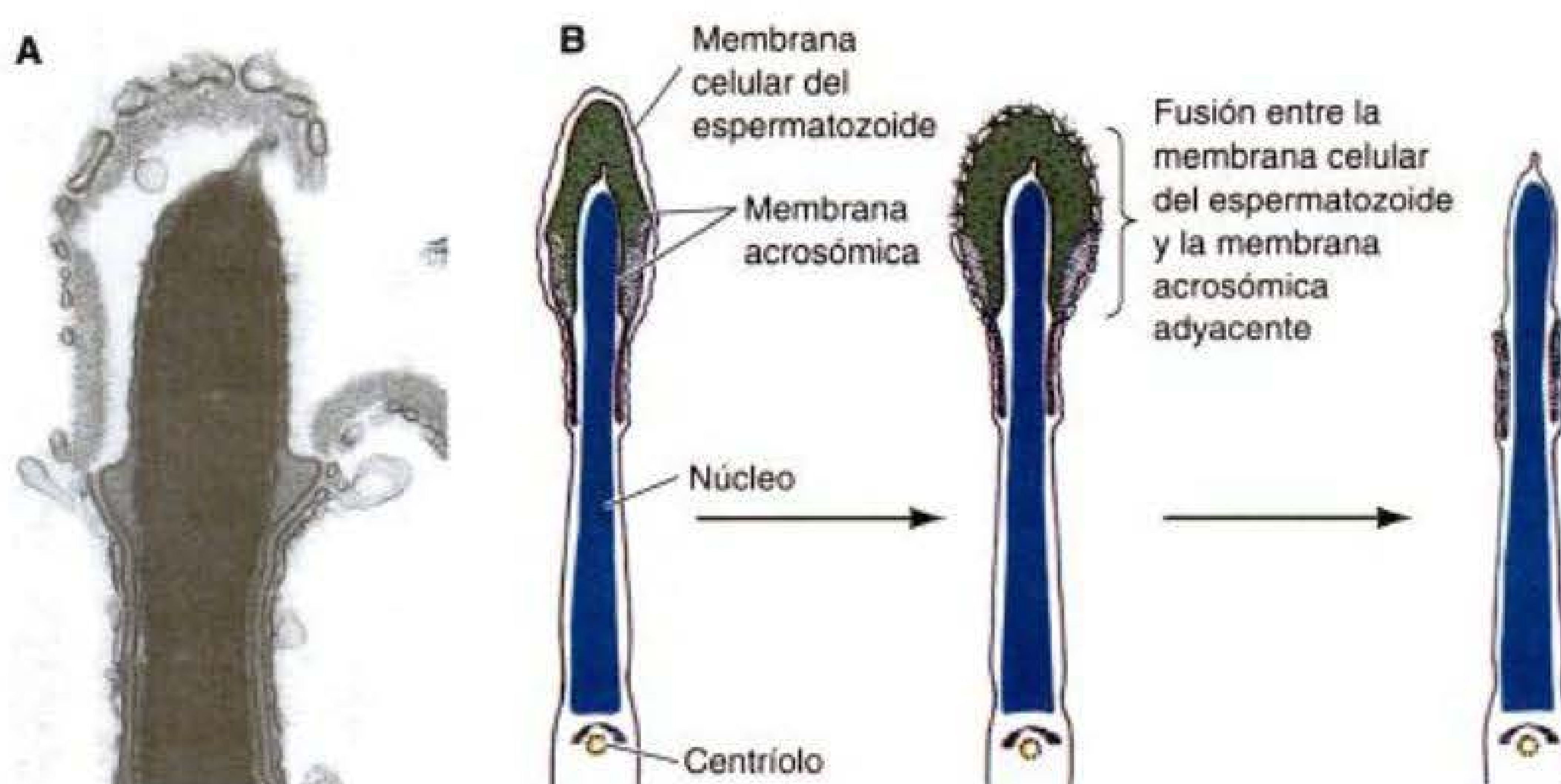


Fig. 7-11. Reacción acrosómica en el espermatozoide del hámster. **A.** Microfotografía electrónica de transmisión de un espermatozoide de hámster experimentando la reacción acrosómica. La membrana acrosómica puede ser vista formando vesículas. **B.** Diagrama interpretativo de las microfotografías electrónicas que muestran la fusión de la membrana acrosómica con la membrana celular en la cabeza del espermatozoide. (**A**, de Meizel 1984, fotografía cortesía de S. Meizel; **B**, según Yanagimachi y Noda 1970.)

Información adicional y especulaciones

Acción a distancia: los gametos de los mamíferos

Es muy dificultoso el estudio de las interacciones que podrían estar produciéndose entre los gametos de mamíferos previamente al contacto espermatozoide-gameto femenino. Una razón obvia para esto es que la fecundación en los mamíferos se produce dentro de las trompas de Falopio (trompas uterinas u oviductos) de la hembra. Mientras que resulta relativamente fácil imitar las condiciones que rodean a la fecundación del erizo de mar (utilizando agua de mar natural o artificial), todavía no se conocen los componentes de los diversos ambientes naturales que encuentra el espermatozoide de mamíferos cuando viaja hacia el gameto femenino. Una segunda razón para esta dificultad es que la población de espermatozoides eyaculados en el tracto femenino es probablemente muy heterogénea, conteniendo espermatozoides en diferentes estadios de maduración. De los 280×10^{16} espermatozoides humanos eyaculados normalmente en el interior de la vagina, solo cerca de 200 alcanzan la región de la ampolla de la trompa de Falopio, donde tiene lugar la fecundación (Ralt y col. 1991). Debido a que menos de 1 espermatozoide en 10.000 se sitúa cerca del gameto femenino, es dificultoso analizar a aquellas moléculas que podrían permitir al espermatozoide nadar hacia el gameto femenino y llegar a ser activados. Hay mucha controversia en relación a los mecanismos que son la base del desplazamiento del espermatozoide de mamífero hacia la trompa de Falopio, sobre la posibilidad de que el gameto femenino pueda atraer a los espermatozoides por quimiotaxis, y en relación a las reacciones de capacitación e hiperactivación que parecen ser necesarias para que algunas especies de espermatozoides se unan al gameto femenino.

Desplazamiento y capacitación

El tracto reproductivo de las hembras de mamíferos juega un papel muy activo en el proceso de fecundación de mamíferos. Mientras que se requiere de la motilidad del espermatozoide para que el espermatozoide de ratón encuentre al ovocito II una vez que éste está en la trompa de Falopio, la motilidad del espermatozoide es probablemente un factor de menor importancia en la adquisición en primer lugar de los espermatozoides en las trompas. Los espermatozoides son hallados en las trompas de Falopio de ratones, hámsteres, cobayos (conejillos de india), vacas y humanos dentro de los 30 minutos de depositado el espermatozoide en la vagina, un tiempo "demasiado breve para haber sido alcanzado aún por el espermatozoide más Olímpico ayudado por su propio poder flagelar" (Storey 1995). En su lugar, el espermatozoide parece ser transportado hacia la trompa de Falopio por la actividad muscular del útero.

Cualquiera sea el medio, los espermatozoides de mamíferos pasan a través del útero y la trompa de Falopio, interactuando con las células y secreciones del tracto reproductor femenino. Los espermatozoides de mamíferos recientemente eyaculados son incapaces de experimentar la reacción acrosómica si no han residido por algún tiempo en el tracto reproductivo femenino (Chang 1951; Austin 1952). El grupo de cambios fisiológicos por el cual el espermatozoide llega a ser competente para fecundar al gameto femenino es denominado **capacitación.** Los requerimientos para la capacitación varían de una especie a otra (Gwatkin 1976). La capacitación puede ser imitada in vitro mediante la incubación de espermatozoides en medio de cultivo de tejido (conteniendo iones de calcio, bicarbonato y albúmina sérica; véase cap. 21) o en fluido a partir de las trompas de Falopio. Los espermatozoides que no están capacitados son "mantenidos" en cúmulos y por lo tanto no alcanzan al gameto femenino (Austin 1960; Corselli y Talbot 1987).

Al contrario de las escenas de apertura de *Mire quién está hablando* de las películas, "la carrera no es siempre al más veloz." Aunque algunos espermatozoides humanos alcanzan la región de la ampolla de la trompa de Falopio dentro de la media hora después del coito, aquellos espermatozoides podrían tener pocas posibilidades de fecundar al gameto femenino. Wilcox y colegas (1995) hallaron que casi todos los embarazos humanos resultan de relaciones sexuales durante un período de 6 días que finaliza el día de la ovulación. Esto significa que el espermatozoide que ha fecundado le podría tomar no menos de 6 días hacer el viaje. Eisenbach (1995) ha propuesto una hipótesis en la cual la capacitación es un evento pasajero, y le es dada a los espermatozoides una ventana de competencia relativamente breve en la que pueden fecundar satisfactoriamente al gameto femenino. Cuando los espermatozoides alcanzan la ampolla, adquieren competencia –pero la pierden si se quedan alrededor de ésta demasiado tiempo. Los espermatozoides pueden tener también diferentes porcentajes de supervivencia dependiendo de su localización dentro del tracto reproductivo, de modo tal que los espermatozoides que llegan tarde pueden tener una mejor posibilidad de éxito que aquellos que arribaron días antes.

Los cambios moleculares que explican la capacitación son todavía desconocidos, pero hay cuatro grupos de cambios moleculares que pueden ser importantes. En primer lugar, la membrana celular del espermatozoide es alterada por la eliminación de colesterol por las proteínas de albúmina en el tracto reproductor femenino (Davis 1978; Cross 1998). Si la albúmina sérica es de manera experimental cargada previamente con colesterol, la capacitación no se producirá in vitro. El efecto del colesterol no es conocido, pero recientes evidencias sugieren que la pérdida de colesterol lleva a un aumento en el pH, que a su vez le permite al espermatozoide experimentar la reacción acrosómica. En segundo lugar, durante la capacitación se pierden proteínas o hidratos de carbono particulares sobre la superficie del espermatozoide (Lopez y col. 1985; Wilson y Oliphant 1987). Es posible que estos compuestos bloqueen los sitios de reconocimiento para las proteínas que se unen a la zona pelúcida. Se ha sugerido (Benoff 1993) que el desenmascaramiento de estos sitios podría ser uno de los efectos de la disminución del colesterol.

En tercer lugar, el potencial de membrana de la membrana celular del

espermatozoide llega a ser más negativo cuando los iones potasio dejan el espermatozoide. Este cambio en el potencial de membrana puede permitir que los canales del calcio sean abiertos y facilitar el ingreso de calcio al espermatozoide. Los iones calcio y bicarbonato pueden ser críticos en la activación de la producción de cAMP y en facilitar los eventos de fusión de membranas de la reacción acrosómica (Visconti y col. 1995; Arnoult y col. 1999). En cuarto lugar, se produce la fosforilación de proteínas (Galantino-Homer y col. 1997). Todavía es incierto si estos cuatro eventos son independientes entre sí y en qué medida cada uno de ellos contribuye a la capacitación de los espermatozoides (fig. 7-12).

Puede haber una conexión importante entre el desplazamiento de los espermatozoides y la capacitación. Timothy Smith (1998) y Susan Suarez (1998) han documentado que antes de ingresar a la ampolla de la trompa de Falopio (donde se produce la fecundación de mamíferos), los espermatozoides sin capacitarse se unen activamente a las membranas de las células de la trompa en el estrecho pasaje (istmo) que precede a ésta (fig. 7-13). Esta unión es temporaria y parece ser rota cuando los espermatozoides llegan a ser capacitados. Además, la vida útil de los espermatozoides es alargada significativamente por esta unión, y su capacitación es enlentecida. Esta restricción de la entrada de los espermatozoides a la ampolla, el enlentecimiento de la capacitación, y la prolongación de la vida útil de los espermatozoides puede tener importantes consecuencias (Töpfer-Petersen y col. 2002). En primer lugar, esta unión puede funcionar como un bloqueo de la polispermia al impedir que muchos espermatozoides alcancen al gameto femenino al mismo tiempo. Si en vacas es extirpado el istmo, se produce un porcentaje mucho más elevado de polispermia. En segundo lugar, el enlentecimiento del porcentaje de capacitación de los espermatozoides y la prolongación de la vida útil de los espermatozoides puede potenciar al máximo la probabilidad de que haya algunos espermatozoides en la ampolla para encontrar al gameto femenino si la eyaculación no se produce al mismo tiempo de la ovulación.

Hiperactivación y quimiotaxis

Distintas regiones del tracto reproductor femenino pueden secretar diferentes moléculas regionalmente específicas. Estos factores pueden influenciar la motilidad de los espermatozoides así como su capacitación. Por ejemplo, cuando los espermatozoides de ciertos mamíferos (especialmente hámsters, cobayos y algunas cepas de ratones) pasan del útero a las trompas de Falopio, se vuelven **hiperactivados**, nadan a altas velocidades y generan una fuerza mayor que antes. Esta hiperactivación parece estar mediada a través de la activación por cAMP de un canal de calcio específico localizado en la cola de los espermatozoides (Ren y col. 2001). Suárez y col. (1991) han demostrado que mientras esta conducta no es propicia para viajar a través de fluidos de baja viscosidad, parece ser extremadamente apropiada para el movimiento lineal de los espermatozoides en el fluido viscoso que los espermatozoides podrían encontrar en las trompas de Falopio. La hiperactivación, más una enzima hialuronidasa sobre el exterior de la membrana celular de los espermatozoides, le permiten a los espermatozoides *digerir* un sendero a través de la matriz extracelular de las células del cúmulo (Lin 1994; Primakoff y Myles 2002). Además de incrementar la actividad de los espermatozoides, los factores solubles en el oviducto también pueden proporcionar el componente direccional del movimiento de los espermatozoides. Se ha especulado en relación a que el gameto femenino (o, más posiblemente, el folículo ovárico en el que éste se desarrolló) puede secretar sustancias quimiotácticas que atraen a los espermatozoides hacia el gameto femenino durante los estadios tardíos de la migración de éstos (véase Hunter 1989). Ralt y col. (1991) analizaron esta hipótesis utilizando fluido folicular de folículos humanos cuyos ovocitos II habían sido utilizados para fecundación in vitro. Llevando a cabo un experimento semejante a uno descrito antes con erizos de mar, ellos microinyectaron una gota de fluido folicular en una gota más grande de suspensión de espermatozoides. Cuando hicieron esto, al-

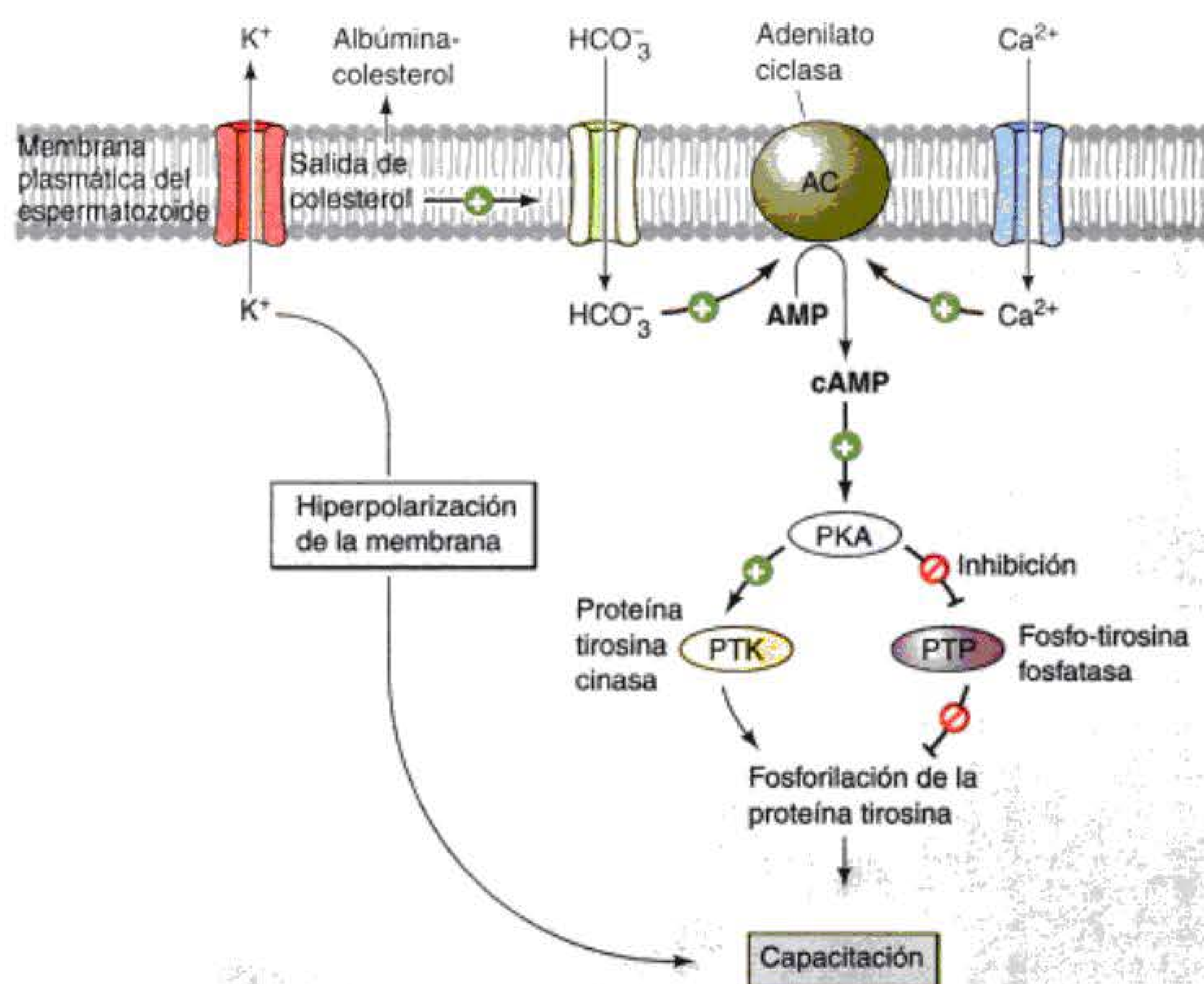


Fig. 7-12. Modelo hipotético para la capacitación del espermatozoide. La salida de potasio (cuya causa se desconoce) da como resultado un cambio en el potencial de reposo de la membrana celular del espermatozoide. La eliminación de colesterol por la albúmina estimula a los canales iónicos que permite ingresar calcio y bicarbonato al espermatozoide. Estos iones promueven la actividad de la adenilato ciclasa, que produce cAMP a partir de AMP. El aumento en cAMP activa a la proteína cinasa A, causando que ésta active a la proteína tirosina cinasa (mientras inactiva a las proteínas fosfatasas). Las cinasas fosforilan proteínas que son esenciales para la capacitación. (Según Visconti y Kopf 1998.)

gunos de los espermatozoides cambiaron su dirección para migrar hacia la fuente de fluido folicular. La microinyección de otras soluciones no tiene este efecto. Estos estudios no descartaron la posibilidad de que el efecto fuera debido a una estimulación general del movimiento o del metabolismo de los espermatozoides. Sin embargo, estas investigaciones dejan al descubierto una correlación fascinante: el fluido de solamente cerca de la mitad de los folículos analizados mostró un efecto quimiotáctico, y casi en cada caso, el ovocito II fue fecundable si, y solo si, el fluido mostraba capacidad quimiotáctica ($P < 0{,}0001$). Posteriores investigaciones han confirmado la capacidad del fluido folicular para atraer in vitro a los espermatozoides humanos, y se ha demostrado que solo los espermatozoides capacitados serán atraídos (Cohen-Dayag y col. 1995; Eisenbach y Tur-Kaspa 1999; Wang y col. 2001). Es posible, entonces, que como en ciertos huevos (gametos femeninos) de invertebrados, el ovocito II humano secrete un factor quimiotáctico solamente cuando éste es capaz de ser fecundado, y que los espermatozoides son atraídos por tal compuesto solamente cuando son capaces de fecundar al ovocito II.

Por lo tanto, el tracto reproductor femenino no es un conducto pasivo a través del cual los espermatozoides corren, sino que es un grupo altamente especializado de tejidos que regula el ritmo de capacitación de los espermatozoides y el acceso al gameto femenino.

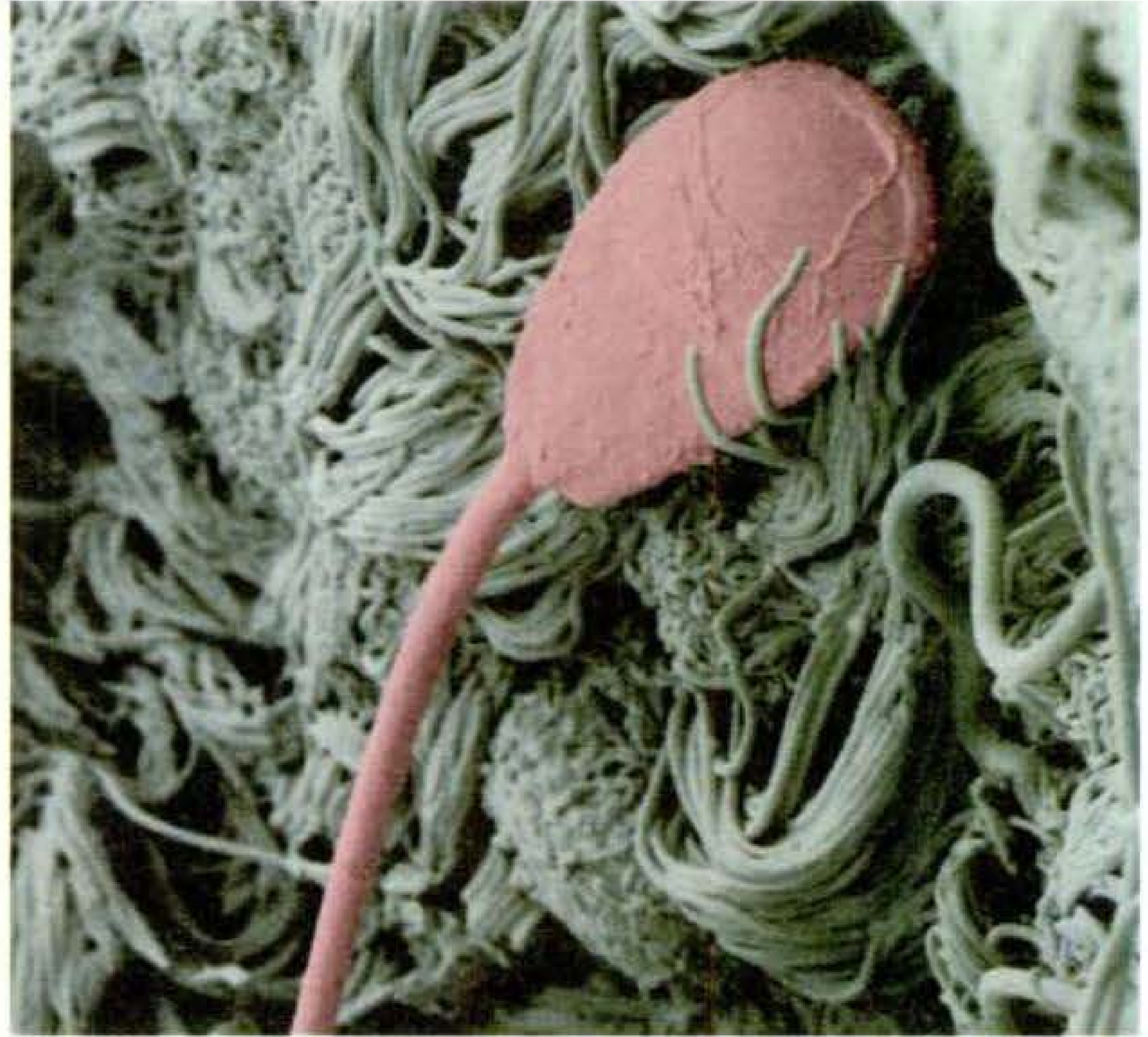


Fig. 7-13. Espermatozoide de mamífero en el tracto reproductor femenino. El espermatozoide del toro se adhiere a las membranas de las células epiteliales en el oviducto de una vaca antes de ingresar a la ampolla. (De Lefebvre y col. 1995; fotografía cortesía de S. Suárez.)

Reconocimiento específico de especie en erizos de mar

Mientras que el contacto del espermatozoide con la capa gelatinosa del óvulo puede proporcionar el primer evento de reconocimiento específico de especie, otro evento crítico de unión específico de especie debe producirse una vez que el espermatozoide del erizo de mar ha atravesado la capa gelatinosa del óvulo y el proceso acrosómico del espermatozoide contacta con la superficie del óvulo (fig. 7-14A). La proteína acrosómica que media este reconocimiento en los erizos de mar es denominada **bindina.** En 1977, Vacquier y colaboradores aislaron a esta proteína no soluble de 30.500-Da a partir del acrosoma del *Strongylocentrotus purpuratus* y hallaron que ésta era capaz de unirse a los óvulos sin capa gelatinosa de la misma especie (fig. 7-14B, Vacquier y Moy 1977). Además, esta interacción con los óvulos es relativamente específica de especie (Glabe y Vacquier 1977; Glabe y Lennarz 1979): bindina aislada a partir de los acrosomas de *S. purpuratus* se une a sus propios óvulos sin capa gelatinosa, pero no lo hace en aquellos de *Arbacia punctulata*. Utilizando técnicas inmunológicas, Moy y Vacquier (1979) demostraron que la bindina está localizada específicamente sobre el proceso acrosómico –exactamente donde debería estar para el reconocimiento entre el espermatozoide y el óvulo (fig. 7-15).

Los estudios bioquímicos han demostrado que la bindina de especies de erizo de mar estrechamente relacionadas son en efecto diferentes.* Este hallazgo implica la existencia de receptores de bindina específicos de especie sobre el óvulo, la membrana vitelina, o la membrana celular. Tales receptores fueron también sugeridos por los experimentos de Vacquier y Payne (1973), quien saturó a los óvulos de erizo de mar con espermatozoides.

* Bindina y otras glucoproteínas de adhesión de gametos son probablemente las proteínas que se conoce que han evolucionado más rápido (Metz y Palumbi 1966; Vacquier 1998). Especies estrechamente relacionadas pueden tener identidades cercanas de cada una de las otras proteínas, pero sus bindinas pueden haber divergido considerablemente. Parecen haber dos dominios específicos de especie en la proteína bindina.

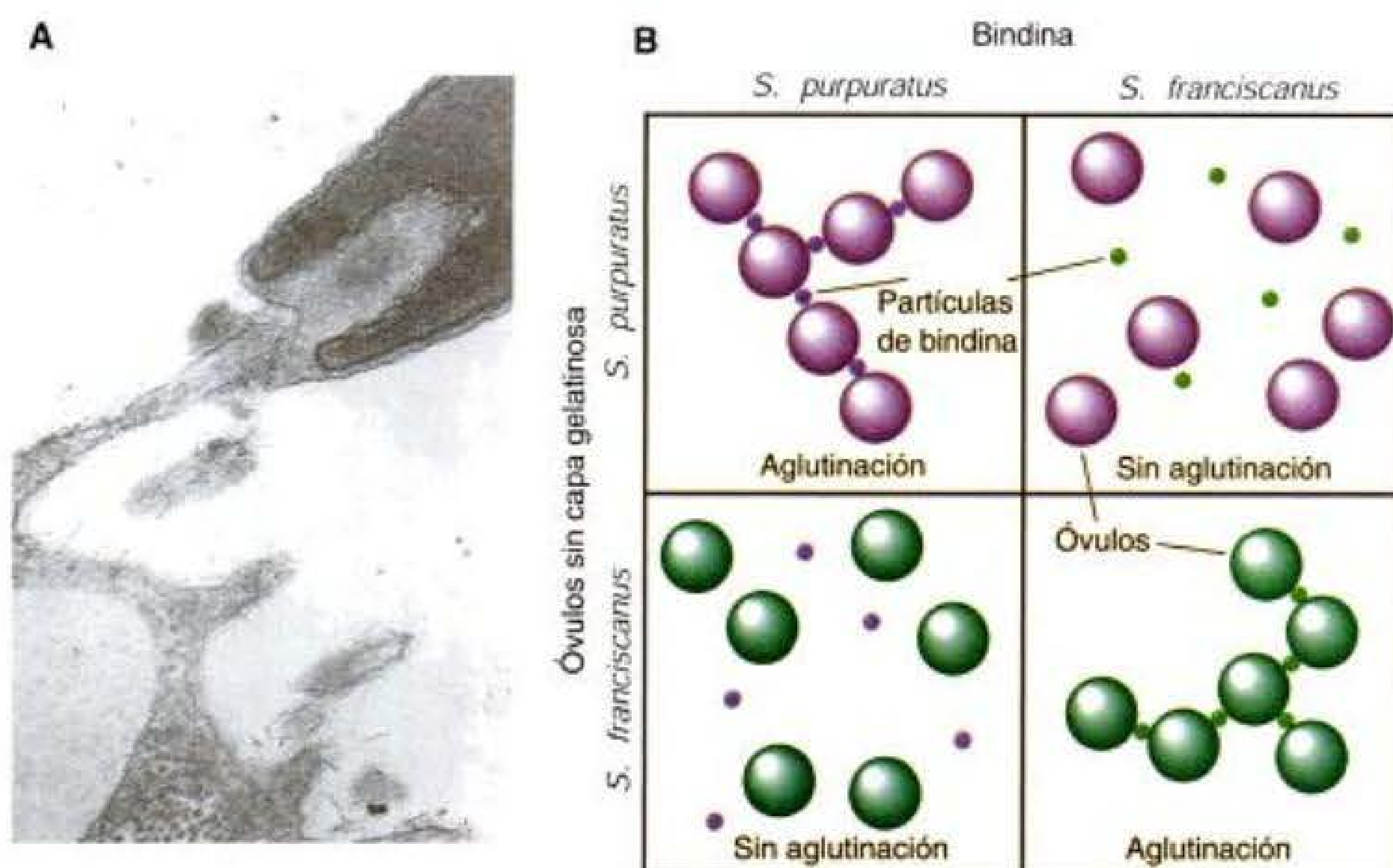


Fig. 7-14. Unión específica de especie del proceso acrosómico a la superficie del óvulo en el erizo de mar. **A.** Contacto real del proceso acrosómico del espermatozoide del erizo de mar con la microvellosidad de un óvulo. **B.** Modelo in vitro de la unión específica de especie. La aglutinación por bindina de los óvulos sin capa gelatinosa fue medida mediante el agregado de bindina a pocillos de plástico conteniendo una suspensión de óvulos. Luego de 2-5 minutos de agitación suave, los pocillos fueron fotografiados. Cada bindina se unió y aglutinó únicamente con óvulos de su propia especie. (**A** de Epel 1977, fotografía cortesía de F. D. Collins y D. Epel; **B** basado en fotografías de Glabe y Vacquier 1977.)

Como se ve en la figura 7-16A, la unión del espermatozoide no se produce sobre la totalidad de la superficie del óvulo. Aun con un número saturante de espermatozoides (aproximadamente 1500), parecen haber lugares sobre el óvulo para más cabezas de espermatozoides, lo cual implica la presencia de un limitado número de sitios de unión de espermatozoides. Una glucoproteína de 350-kDa que ha sido aislada de los óvulos del erizo de mar tiene algunas de las propiedades esperadas de un receptor de bindina (Giusti y col. 1997; Stears y Lennarz 1997; Hirohashi y Lennarz 2001). Se piensa que los receptores de bindina están agregados en complejos sobre la superficie celular del óvulo, y que cientos de estos complejos pueden ser necesarios para adherir el espermatozoide al óvulo (fig. 7-16B). Por lo tanto, el reconocimiento específico de especie de los gametos del erizo de mar se produce a niveles de la atracción de los espermatozoides, de la activación de los espermatozoides y de la adhesión de los espermatozoides sobre la superficie del óvulo.

SITIO WEB 7.4 **La discusión Lillie-Loeb sobre la unión espermatozoide-gameto femenino (The Lillie-Loeb dispute over sperm-egg binding).** A comienzos del 1900, la investigación en fecundación estuvo enmarcada por una polémica entre F. R. Lillie y Jacques Loeb, quienes estaban en desacuerdo sobre si el espermatozoide reconocía al gameto femenino a través de factores solubles o mediante interacciones célula-célula.

Unión de gametas y reconocimiento en mamíferos

ZP3: LA PROTEÍNA DE LA ZONA PELÚCIDA DEL RATÓN QUE UNE ESPERMATOZOIDES. La zona pelúcida en mamíferos juega un papel análogo al de la membrana vitelina en invertebrados. Esta matriz glucoproteica, que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento, juega dos papeles principales durante la fecundación: une al espermatozoide, y da comienzo a la reacción acrosómica luego de la unión del espermatozoide (Staling y col. 1979; Florman y Storey 1982; Cherr y col. 1986). La unión del espermatozoide a la zona pelúcida es de mane-



Fig. 7-15. Localización de bindina sobre el proceso acrosómico. **A.** Técnica inmunohistoquímica para localizar a la bindina. Fue producido un anticuerpo de conejo para la proteína bindina, y este anticuerpo fue incubado con espermatozoides que habían experimentado la reacción acrosómica. Si bindina estuviese presente, el anticuerpo se mantendría unido al espermatozoide. Luego de lavar el anticuerpo que no se había unido, el espermatozoide fue tratado con anticuerpo de cerdo que estaba unido covalentemente a las enzimas peroxidasas. El anticuerpo de cerdo se une al anticuerpo de conejo, colocando moléculas de peroxidasa en todos los sitios en los que estaba presente bindina. La peroxidasa cataliza la formación de un precipitado oscuro de diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, este precipitado solo es formado en donde bindina estaba presente. **B.** Localización de bindina en el proceso acrosómico después de la reacción acrosómica (33.200×). **C.** Localización de bindina en el proceso acrosómico en la unión del espermatozoide y el gameto femenino. (**B** y **C**, de Moy y Vacquier 1979; fotografías cortesía de V. D. Vacquier.)

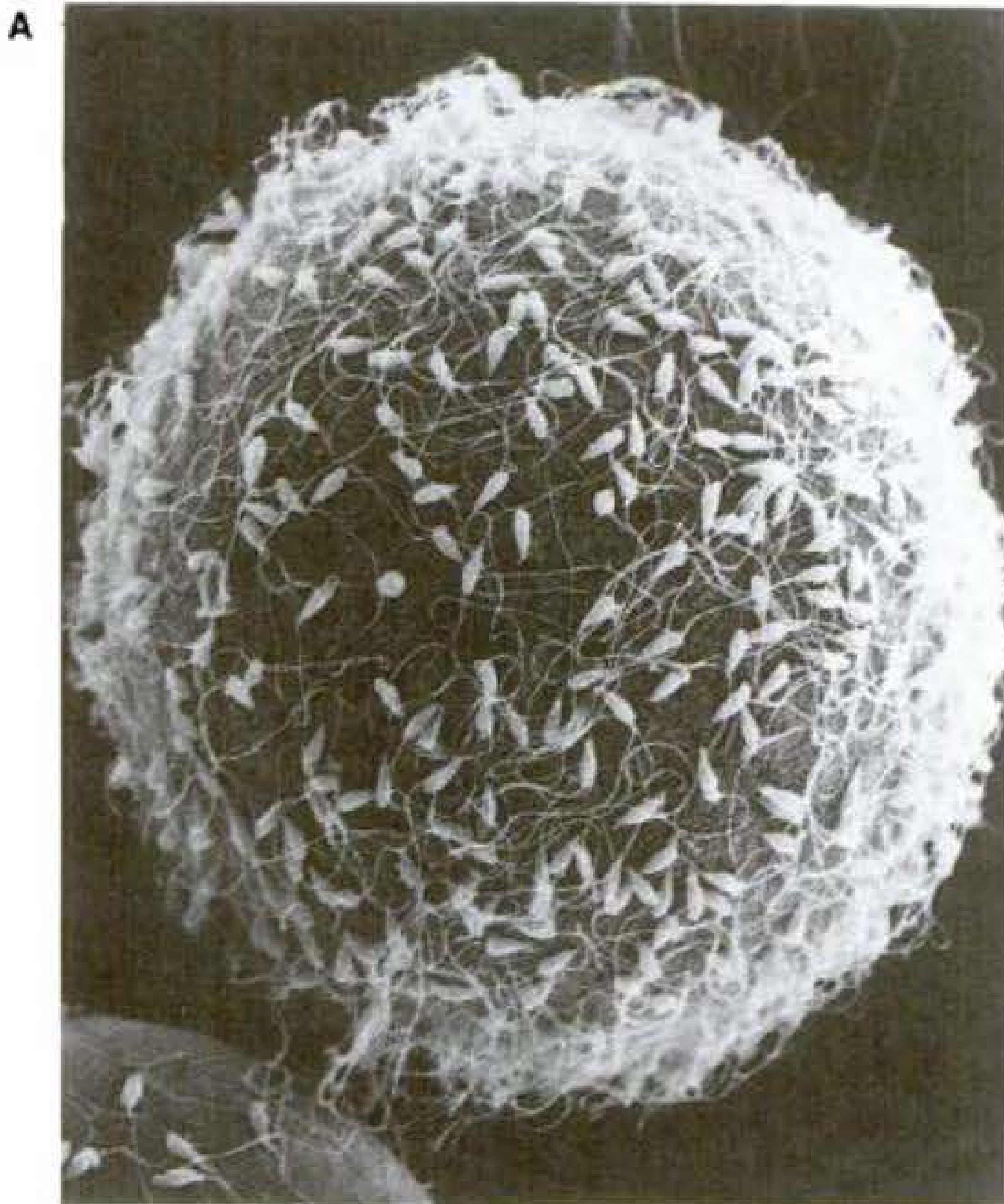
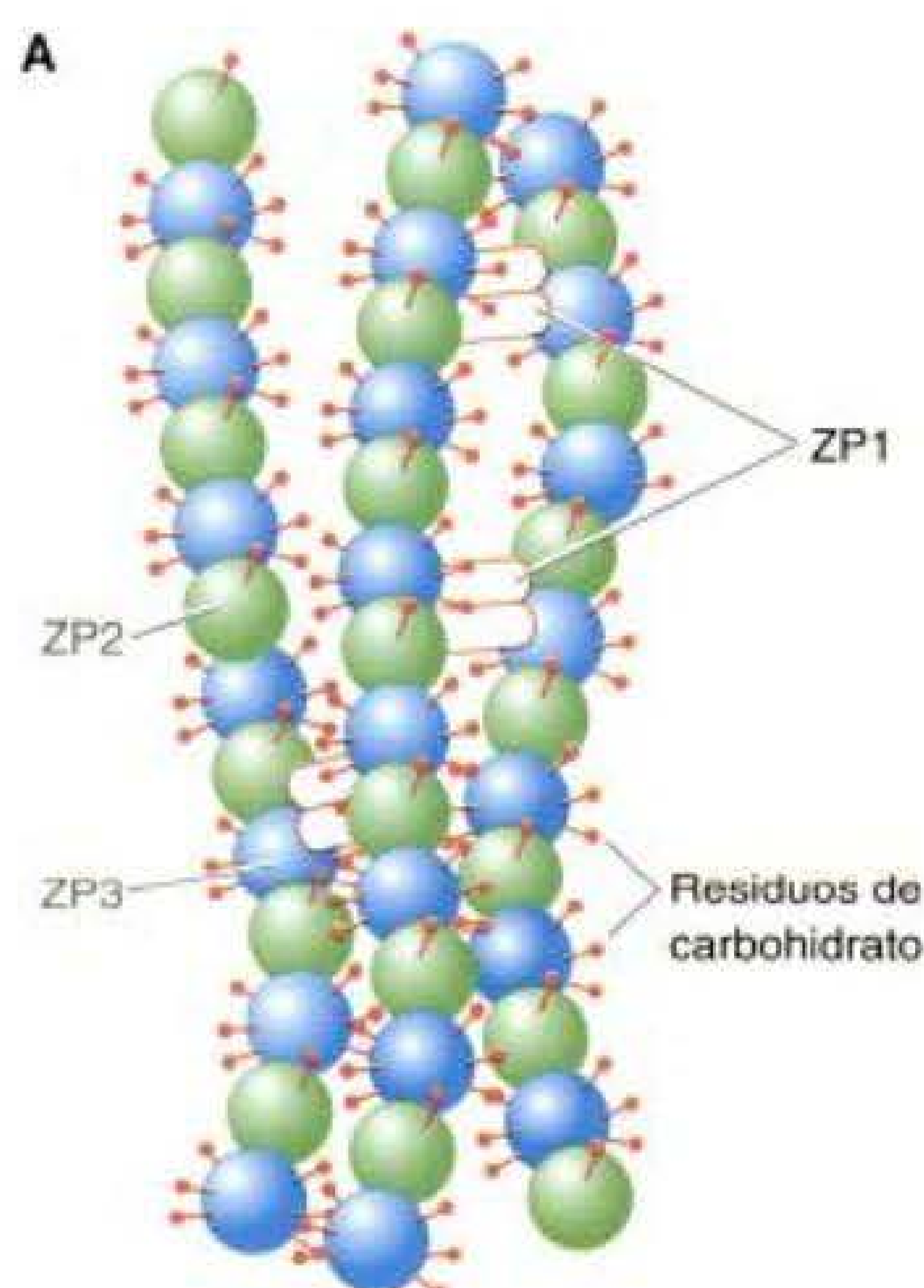




Fig. 7-16. Receptores de bindina sobre el óvulo. **A.** Microfotografía electrónica de barrido de espermatozoides de erizo de mar unidos a la membrana vitelina de un óvulo. Aunque este óvulo está saturado de espermatozoides, parece haber espacio sobre la superficie para más espermatozoides, implicando la existencia de un limitado número de receptores de bindina. **B.** Unión de los espermatozoides de *S. purpuratus* a bolitas de poliestireno que han sido cubiertas con proteína receptora de bindina purificada. (**A**, fotografía cortesía de C. Glabe, L. Pérez y W. J. Lennarz; **B**, de Foltz y col. 1993.)

ra relativa pero no absoluta, específica de especie. (El reconocimiento específico de especie de los gametos no es un problema fundamental cuando la fecundación se produce internamente.)

La zona pelúcida de ratón está formada por tres glucoproteínas principales, ZP1, ZP2 y ZP3. Hay varias partes de pruebas que demuestran que **ZP3** (proteína de zona 3) es la glucoproteína que inicialmente une al espermatozoide. La unión del espermatozoide de ratón a la zona pelúcida del ratón puede ser inhibida por una primera incubación del espermatozoide con glucoproteínas de zona solubilizadas. Utilizando este ensayo de inhibición, Bleil y Wassarman (1980, 1986, 1988) hallaron que ZP3 era el competidor activo para la unión del espermatozoide (fig. 7-17). En otras palabras, es evidente a partir de este ensayo que la proteína purificada ZP3 (pero no ZP1 o ZP2) puede unirse a los espermatozoides e impedir la unión de los espermatozoides a la zona pe-



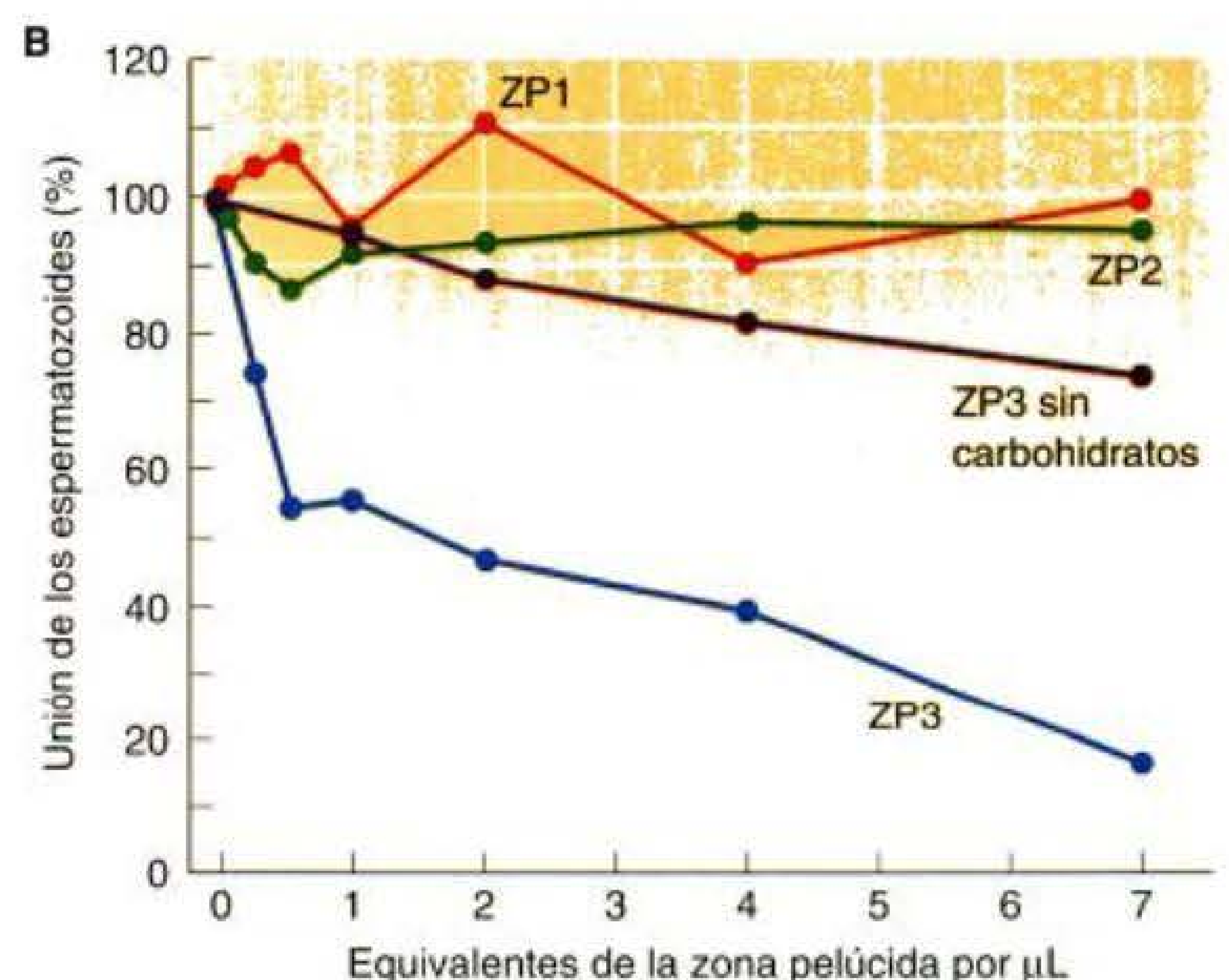


Fig. 7-17. ZP3 de ratón, la proteína de la zona pelúcida que une espermatozoides. **A.** Esquema de la estructura fibrilar de la zona pelúcida del ratón. Los principales filamentos de la zona pelúcida están compuestos de dímeros repetidos de las proteínas ZP2 y ZP3. Estos filamentos están ocasionalmente entrelazados por ZP1, forman una red tipo malla. **B.** Ensayo de inhibición mostrando la disminución específica de la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida cuando el espermatozoide y la zona son incubados con cantidades aumentadas de la glicoproteína ZP3. Tambien se indica en el gráfico la importancia de la porción carbohidrato de la ZP3. (**A**, según Wassarman 1989; **B**, según Bleil y Wassarman 1980 y Florman y Wassarman 1985.)

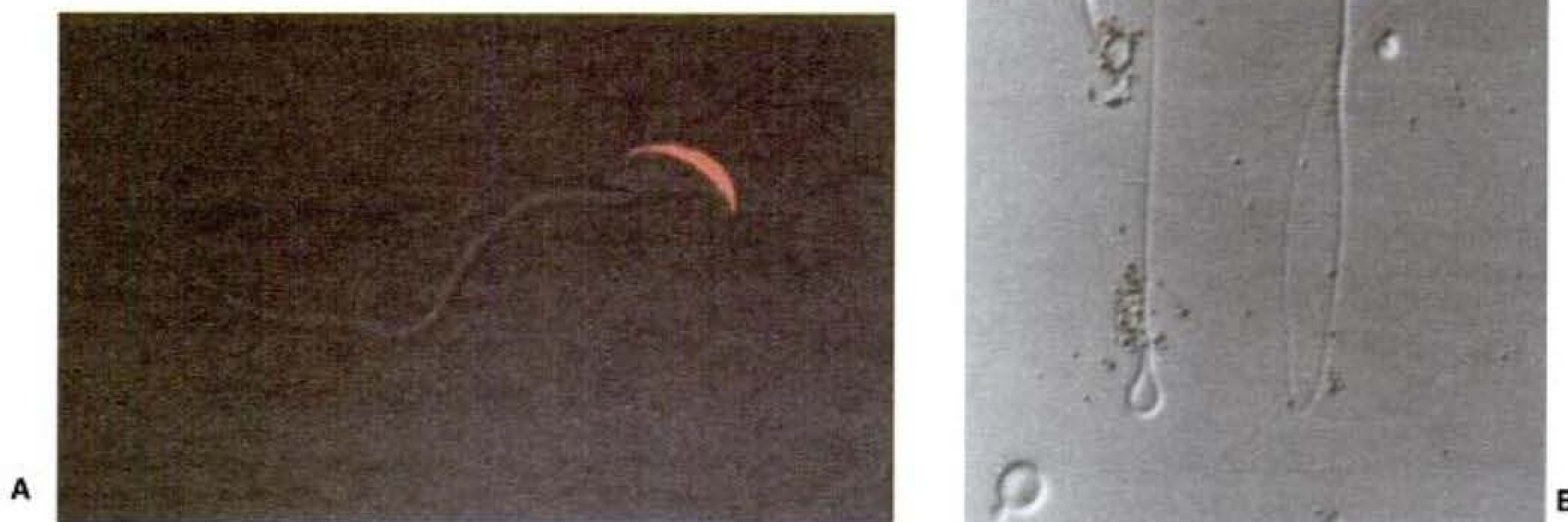


Fig. 7-18. Proteínas que unen a los espermatozoides a la ZP3 de la zona pelúcida. A. Las proteínas sobre el espermatozoide del ratón que se unen a la ZP3 están localizadas en la membrana plasmática que recubre al acrosoma. En esta imagen de confocal, la proteína que une ZP3 está teñida de rojo mediante un anticuerpo inmunofluorescente. B. ZP3 marcada radiactivamente unida a un espermatozoide de ratón capacitado. (A, fotografía por F. Suzuki, M. Toyota, J. Maekawa, J. Bleil y J. Cheng, cortesía de J. Bleil; B, de Bleil y Wassarman 1986, fotografía cortesía de los autores.)

lúcida. Esto fue confirmado mediante el hallazgo que la ZP3 radiomarcada (pero no ZP1 o ZP2) se une a las cabezas de los espermatozoides de ratón con acrosomas intactos (fig. 7-18B).

La membrana celular que recubre la cabeza del espermatozoide puede unir a cientos de glucoproteínas de ZP3 en la zona pelúcida. Además, parece haber varias proteínas diferentes sobre el espermatozoide que son capaces de unir ZP3 (fig. 7-18A; Wassarman y col. 2001). Muchas de estas proteínas de espermatozoides se unen a las cadenas de carbohidratos enlazadas por serina y treonina a la ZP3, sugiriendo que los carbohidratos de la ZP3 son críticos para la unión del espermatozoide a la zona pelúcida. Esta conclusión ha sido confirmada mediante el hallazgo de que si estos grupos de carbohidratos son eliminados de la ZP3, no unirán espermatozoides tan bien como con ZP3 intacta (véase fig. 7-17B, Florman y Wassarman 1985; Kopf 1998).

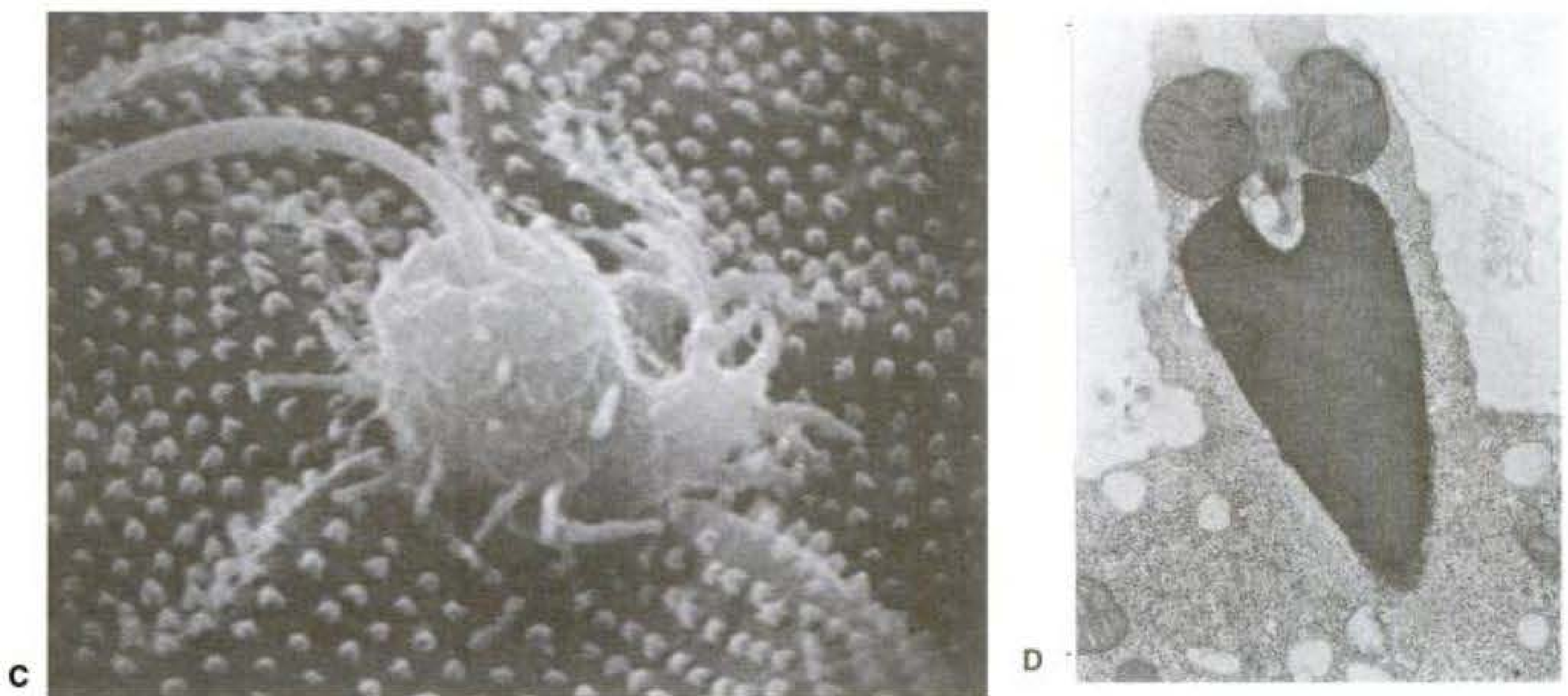
INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA DE MAMÍFEROS POR ZP3. ZP3 es la glucoproteína específica que une al espermatozoide a la zona pelúcida del ratón. ZP3 además inicia la reacción acrosómica después de producida la unión del espermatozoide a ésta. La zona pelúcida del ratón, a diferencia de la membrana vitelina del erizo de mar, es una estructura gruesa. Al experimentar la reacción acrosómica sobre la zona pelúcida, los espermatozoides del ratón pueden concentrar sus enzimas proteolíticas directamente en los punto de adhesión y digerir un agujero a través de esta capa extracelular (véase fig. 7-8B). En efecto, los espermatozoides de ratón que experimentan la reacción acrosómica antes de alcanzar la zona pelúcida son incapaces de penetrarla (Florman y col. 1998).

La reacción acrosómica de los espermatozoides de ratón es inducida cuando la ZP3 enlaza (*crosslink*) a los receptores sobre la membrana celular del espermatozoide (Endo y col. 1987; Leyton y Saling 1989). Una de las proteínas de espermatozoides que es enlazada es la **galactosiltransferasa-I**, una enzima intramembranosa cuyos sitios activos miran hacia el exterior y se unen a los residuos de carbohidratos de la ZP3. Este enlazamiento activa a proteínas G específicas en la membrana celular del espermatozoide, dando inicio a una cascada que abre los canales del calcio de la membrana y provoca la exocitosis mediada por calcio de la vesícula acrosómica (Leyton y col. 1992; Florman y col. 1998; Shi y col. 2001). El calcio parece activar las mismas proteínas de fusión del citoesqueleto (el complejo SNARE) que son activadas en la exocitosis de las células pancreáticas (liberando enzimas digestivas), de las neuronas (liberando neurotransmisores), y de los mastocitos o células cebadas (liberando histamina) (Tomes y col. 2002).

ATRAVESAR LA ZONA PELÚCIDA. La exocitosis de la vesícula acrosómica libera una variedad de proteasas que degradan la zona pelúcida (Yamagata y col. 1999). Estas enzimas crean un agujero a través del cual el espermatozoide puede viajar hacia el ovocito II. Sin embargo, durante la reacción acrosómica, la porción anterior de la membrana celular del espermatozoide (es decir, la región conteniendo los sitios de unión a ZP3) es eliminada del espermatozoide (véases fig. 7-11). Pero si los espermatozoides van a penetrar la zona pelúcida, ellos deben de algún modo conservar su adhesión a ella. En ratones, parece que esta unión secundaria a la zona pelúcida es llevada a cabo por proteínas en la membrana acrosómica interna que se unen específicamente a la

Fig. 7-19. Microfotografías electrónicas de barrido de la entrada del espermatozoide en un óvulo de erizo de mar. **A.** Contacto de la cabeza del espermatozoide con las microvellosidades del óvulo a través del proceso acrosómico. **B.** Formación del cono de fecundación. **C.** Internalización del espermatozoide dentro del óvulo. **D.** Microfotografía electrónica de transmisión de la internalización del espermatozoide a través del cono de fecundación. (A-C, de Schatten y Mazia 1976, fotografías cortesía de G. Schatten; D, fotografía cortesía de F. J. Longo.)

A B



glucoproteína **ZP2** (Bleil y col. 1988). Mientras que el espermatozoide con el acrosoma intacto no se unirá a la ZP2, sí lo harán los espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosómica. Además, los anticuerpos contra la glucoproteína ZP2 no impedirán la unión a la zona pelúcida de los espermatozoides con el acrosoma intacto, pero inhibirán la adhesión de los espermatozoides con reacción acrosómica. La estructura de la zona pelúcida consiste en unidades repetidas de ZP3 y ZP2, enlazadas ocasionalmente por ZP1 (véase fig. 7-17A). Parece que los espermatozoides con reacción acrosómica transfieren su unión con la ZP3 a las moléculas adyacentes de ZP2.*

* En los cobayos, se piensa que la unión secundaria a la zona pelúcida está mediada por la proteína PH-20. Además, cuando esta proteína de la membrana acrosómica interna fue inyectada a un cobayo macho o hembra adulto, el 100% llegó a ser estéril por varios meses (Primakoff y col. 1988). El suero sanguíneo de estos cobayos estériles tenía concentraciones extremadamente altas de anticuerpos contra PH-20. El antisuero de cobayo esterilizó de este modo no solo específicamente la unión a PH-20, sino que también bloqueó la adhesión in vitro del espermatozoide a la zona pelúcida. El efecto anticonceptivo duró varios meses, luego de la restauración de la fecundación. Estos experimentos demuestran que el principio de anticoncepción inmunológica está bien fundado.

Fusión de gametos y prevención de la polispermia

Fusión de las membranas celulares del gameto femenino y del espermatozoide

Una vez que el espermatozoide ha experimentado la reacción acrosómica y ha viajado hacia el gameto femenino, puede comenzar la fusión de la membrana celular del espermatozoide con la membrana celular del gameto femenino.

El ingreso de un espermatozoide a un óvulo de erizo de mar es ilustrado en la figura 7-19. La fusión espermatozoide-óvulo parece causar la polimerización de actina en el óvulo para formar un **cono de fecundación** (Summers y col. 1975; Schatten y Schatten 1980; Terasaki 1996). La homología entre el gameto femenino y el espermatozoide es demostrada nuevamente, debido a que el proceso acrosómico también parece ser formado por la polimerización de actina. La actina a partir de los gametos forma una conexión que ensancha el puente citoplasmático entre el gameto femenino y el espermatozoide, y el núcleo del espermatozoide y el contenido de la cola pasan a través de este puente. Un proceso similar se produce durante la fusión de los gametos de mamíferos (Yanagimachi y Noda 1970; fig. 7-20).

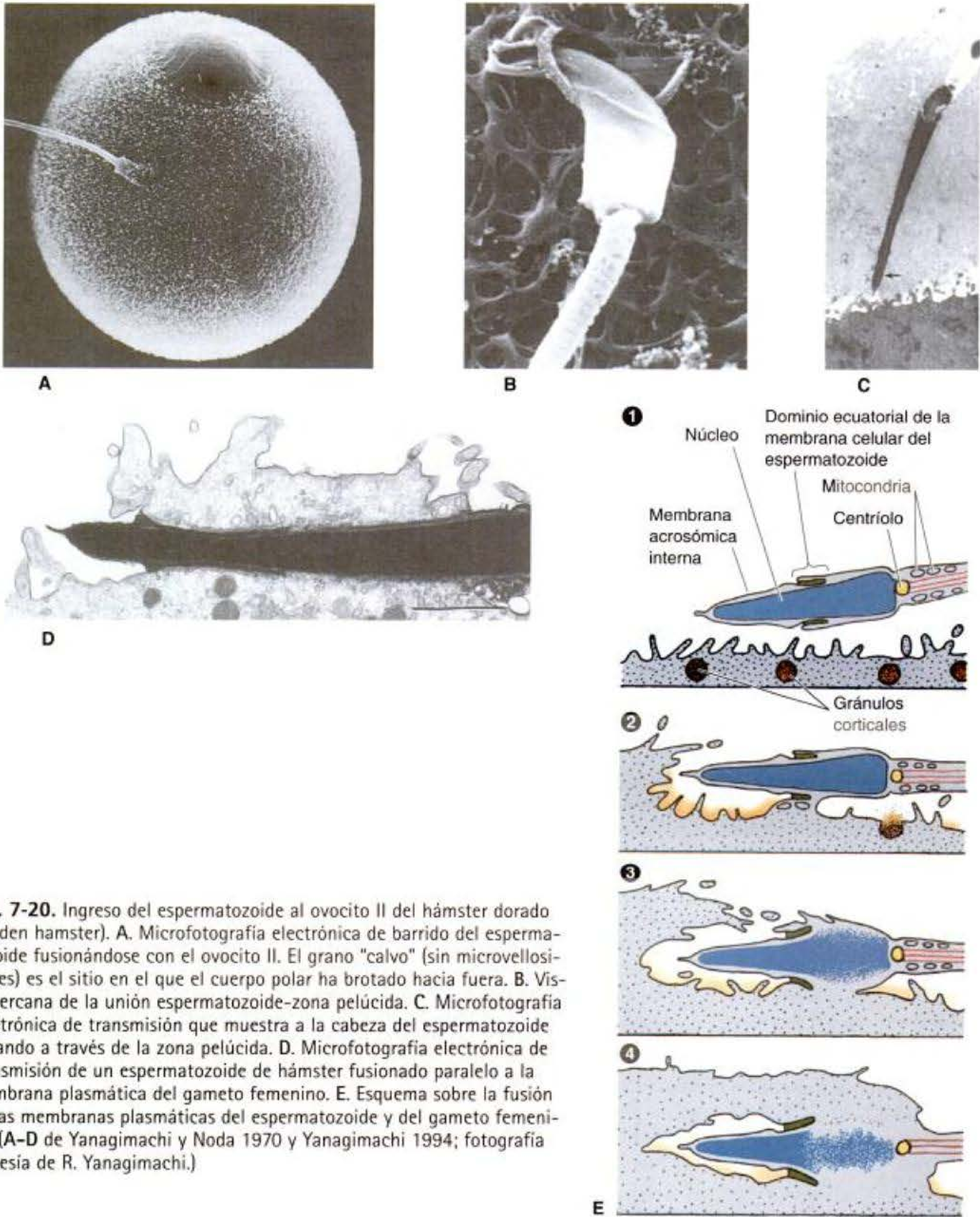
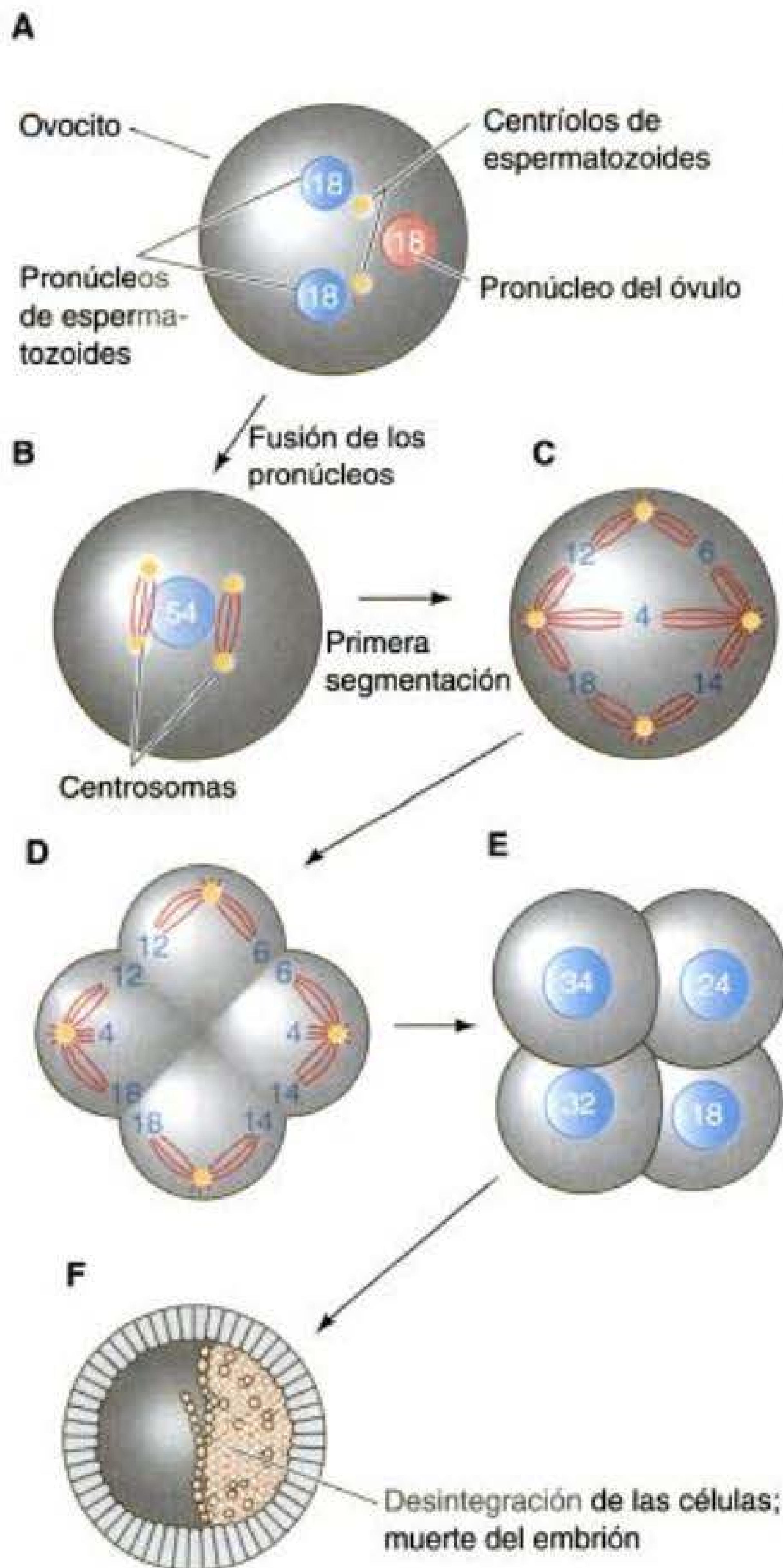


Fig. 7-20. Ingreso del espermatozoide al ovocito II del hámster dorado (golden hamster). **A.** Microfotografía electrónica de barrido del espermatozoide fusionándose con el ovocito II. El grano "calvo" (sin microvellosidades) es el sitio en el que el cuerpo polar ha brotado hacia fuera. **B.** Vista cercana de la unión espermatozoide-zona pelúcida. **C.** Microfotografía electrónica de transmisión que muestra a la cabeza del espermatozoide pasando a través de la zona pelúcida. **D.** Microfotografía electrónica de transmisión de un espermatozoide de hámster fusionado paralelo a la membrana plasmática del gameto femenino. **E.** Esquema sobre la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del gameto femenino. (**A-D** de Yanagimachi y Noda 1970 y Yanagimachi 1994; fotografía cortesía de R. Yanagimachi.)

En el erizo de mar, todas las regiones de la membrana celular del óvulo son capaces de fusionarse con el espermatozoide. En varios casos de otras especies, ciertas regiones de la membrana están especializadas para el reconocimiento y fusión del espermatozoide (Vacquier 1979). La fusión es un proceso activo, a menudo mediado por proteínas "fusogénicas" específicas. Se ha sugerido que la unión del espermatozoide del erizo de mar juega un segundo papel como proteína fusogénica. Además de reconocer al óvulo, la bindina contiene una larga extensión de aminoácidos hidrofóbicos cerca de su amino terminal, y esta región es capaz de fusionar in vitro vesículas de fosfolípido (Ulrich y col. 1998, 1999).

En mamíferos, el espermatozoide no contacta al gameto femenino en su extremo (como en los erizos de mar), sino sobre el costado de la cabeza, en una región denominada el dominio ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (véase fig. 7-20). El mecanismo de fusión de los gametos de mamíferos todavía es motivo de polémica (véase Primakoff y Myles 2002). Los experimentos de knockout génico sugieren que la fusión de los gametos de mamíferos podría depender de la interacción entre una proteína de espermatozoide y una proteína integrina asociada a CD9 sobre el gameto femenino (Le Naour y col. 2000; Miyado y col. 2000; Evans 2001). Los ratones hembra portadores de un knockout génico para CD9 son



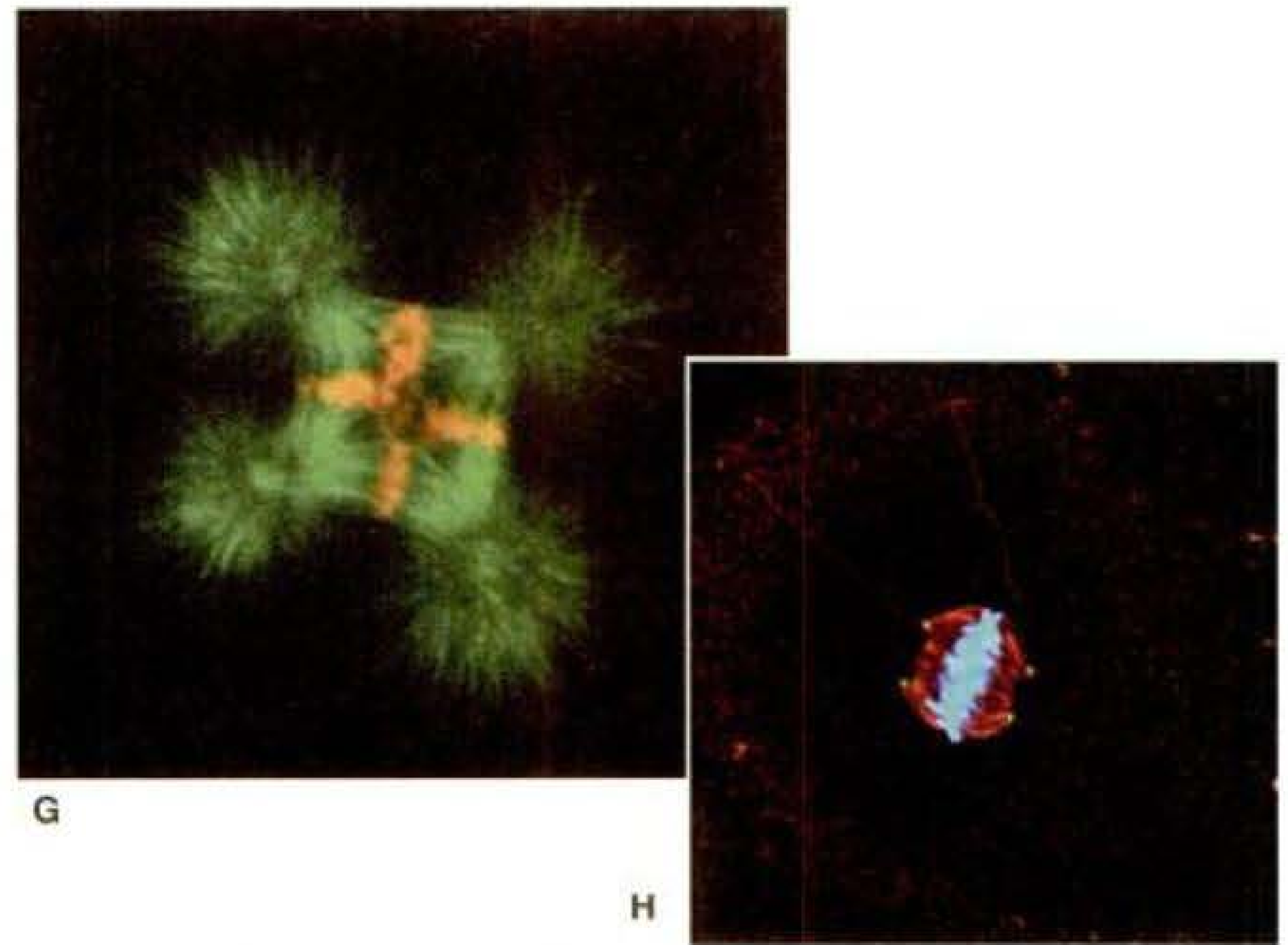


Fig. 7-21. Desarrollo aberrante en los cigotos de erizos de mar dispérmicos. **A.** Fusión de tres núcleos haploides, cada uno conteniendo 18 cromosomas, y la división de los dos centríolos de los espermatozoides para formar cuatro centrosomas (polos mitóticos). **B, C.** Los 54 cromosomas distribuidos de manera azarosa en los cuatro husos mitóticos. **D.** Durante la anafase de la primera división, los cromosomas duplicados son desplazados hacia los cuatro polos. **E.** Se forman cuatro células conteniendo diferentes números y tipos de cromosomas, causando de este modo **F**, la muerte temprana del embrión. **G.** Primera metafase de un cigoto de erizo de mar dispérmico similar al de **D**. Los microtúbulos están teñidos de verde, y la tinción del DNA aparece de amarillo. El DNA triploide está siendo separado en cuatro células. **H.** Cigoto dispérmico humano en la primera mitosis. Los cuatro centríolos están teñidos de amarillo, mientras los microtúbulos del huso mitótico (y las colas de los dos espermatozoides) están teñidos de rojo. Los tres grupos de cromosomas divididos por estos cuatro polos están teñidos de azul. (A-F, según Boveri 1907; G, fotografía cortesía de J. Holy; H, de Simerly y col. 1999, fotografía cortesía de G. Schatten.)

infértiles debido a que sus ovocitos II no pueden fusionarse con el espermatozoide. Esta esterilidad puede ser revertida mediante la microinyección de mRNA que codifica CD9 de ratón o humano (Kaji y col. 2002). No se conoce exactamente como estas proteínas facilitan la fusión de membranas, pero se sabe que CD9 es crítico en la fusión de los miocitos (los precursores de las células musculares) para formar el miotubo multinucleado del músculo estriado (Tachibana y Hemler 1999).

La prevención de la polispermia

Tan rápido como un espermatozoide ha ingresado a un gameto femenino, la capacidad de fusión de la membrana, que era necesaria para conseguir que el contenido del espermatozoide ingrese al gameto femenino, se convierte en una peligrosa desventaja. En erizos de mar, como en la mayoría de los animales estudiados, cualquier espermatozoide que ingrese al óvulo puede proporcionar un núcleo haploide y un centríolo al cigoto*. En la **monospermia** normal, en la que solo un espermatozoide ingresa al gameto femenino, un núcleo haploide de espermatozoide y un núcleo haploide del gameto femenino se combinan para formar el núcleo diploide del gameto femenino fecundado (célula huevo o cigoto), por lo tanto se restablece el número cromosómico apropiado para las especies. El centríolo, que es proporcionado por el espermatozoide, se divide para formar los dos polos del huso mitótico durante la segmentación.

La entrada de múltiples espermatozoides –**polispermia**– lleva a desastrosas consecuencias en la mayoría de los organismos. En los erizos de mar, la fecundación por dos espermatozoides resulta en un núcleo triploide, en el que cada cromosoma está representado tres veces en lugar de dos. Peor aún, puesto que cada centríolo del espermatozoide se divide para formar los dos polos de un aparato mitótico, en lugar de un huso mitótico bipolar separando a los cromosomas en dos células, los cromosomas triploides se pueden dividir en al menos cuatro células. Debido a que no hay mecanismos que aseguren que cada una de las cuatro células reciba el número y tipo apropiado de cromosomas, los cromosomas son repartidos desigualmente. Algunas células reciben copias extra de ciertos cromosomas y otras células carecen de ellos. Theodor Boveri demostró en 1902 que tales células mueren o se desarrollan anormalmente (fig. 7-21).

Las especies han evolucionado distintos modos para impedir la unión de más de dos núcleos haploides. La

* *Nota del traductor:* una vez establecido el contacto y fusión de ambos gametos, la célula pasa a denominarse célula huevo o cigoto, o se puede decir que es un huevo en estadio de cigoto.

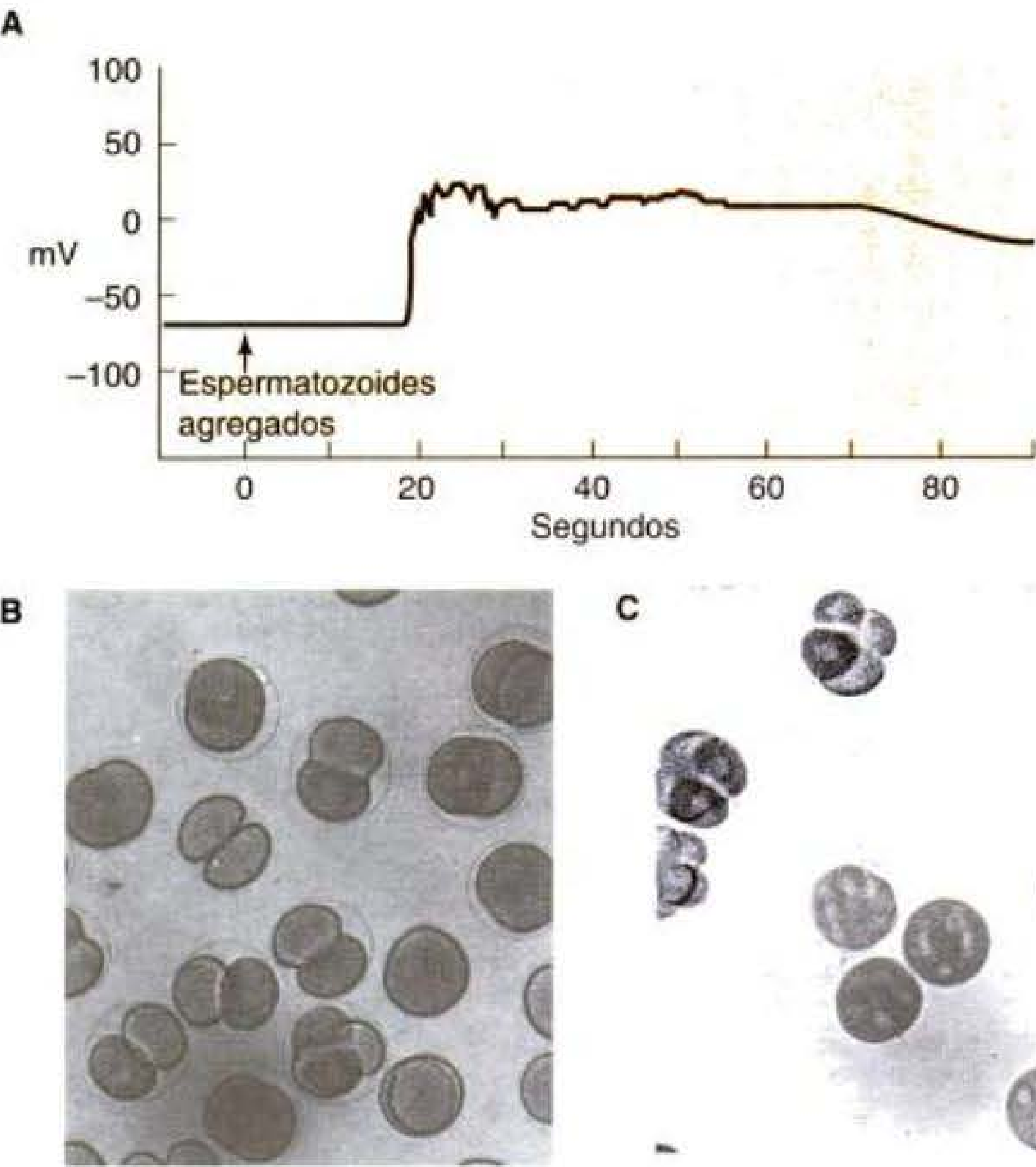
forma más común es evitar la entrada de más de un espermatozoide en el gameto femenino. El óvulo del erizo de mar tiene dos mecanismos para evitar la polispermia: una reacción rápida, llevada a cabo por un cambio eléctrico en la membrana celular del óvulo, y una reacción más lenta, causada por la exocitosis de los gránulos corticales (Just 1919).

EL BLOQUEO RÁPIDO DE LA POLISPERMIA. El **bloqueo rápido de la polispermia** es alcanzado cambiando el potencial eléctrico de la membrana celular del gameto femenino. Esta membrana proporciona una barrera selectiva entre el citoplasma del gameto femenino y el ambiente externo, de modo tal que la concentración iónica del gameto femenino difiere ampliamente de aquella de su alrededor. Esta diferencia de concentración es especialmente significativa para los iones de sodio y de potasio. El agua de mar tiene una concentración particularmente alta del ión sodio, mientras que el citoplasma del óvulo contiene relativamente poco sodio. Lo inverso sucede con los iones de potasio. Esta condición es mantenida por la membrana celular, que tenazmente inhibe la entrada de los iones de sodio al ovocito e impide que los iones de potasio se filtren hacia el ambiente. Si se inserta un electrodo en un gameto femenino y se coloca un segundo electrodo fuera de éste, se puede medir la diferencia constante en cargas a través de la membrana celular del gameto femenino. Este **potencial de membrana en reposo** es generalmente cercano a 70 mV, usualmente expresado como –70 mV debido a que el interior celular está cargado negativamente con respecto al exterior.

Dentro de 1-3 segundos después de la unión del primer espermatozoide, el potencial de membrana cambia a un nivel positivo, cercano a + 20 mV (Longo y col. 1986). Este cambio es causado por un pequeño influjo de iones sodio en el cigoto (gameto femenino recién fecundado) (fig. 7-22A). Aunque el espermatozoide puede fusionarse con las membranas teniendo un potencial de reposo de –70 mV, no puede fusionarse con membranas que tienen un potencial de reposo positivo, entonces no se pueden fusionar más espermatozoides al gameto femenino. No se conoce si la permeabilidad incrementada al sodio del gameto femenino es debida a la unión del primer espermatozoide o a la fusión del primer espermatozoide con el gameto femenino (Gould y Stephano 1987, 1991, McCulloh y Chambers 1992).

La importancia de los iones de sodio y del cambio en el potencial de reposo fue demostrada por Laurinda Jaffe y col. Ellos encontraron que la polispermia puede ser inducida si a los óvulos de erizo de mar se les suministra artificialmente una corriente eléctrica que mantenga el potencial de membrana negativo. Por el contrario, la fecundación puede ser impedida en su totalidad al mantener artificialmente el potencial de membrana de los óvulos positivo (Jaffe 1976). El bloqueo rápido de la polispermia puede además ser burlado disminuyendo la concentración de los iones de sodio en el agua de mar que lo rodea (fig. 7-22B-D). Si el suministro de iones sodio no es suficiente para causar el cambio positivo del potencial de membrana, se produce la polispermia (Gould-Somero y col. 1979; Jaffe 1980).

Se desconoce cómo actúan los cambios en el potencial de membrana del gameto femenino sobre el espermatozoide para bloquear una fecundación secundaria. Muy probablemente, el espermatozoide lleva un componente voltaje sensible (posiblemente una proteína fusogénica cargada positivamente), y la inserción de este componente en la membrana celular del gameto femenino puede ser regulada por la carga eléctrica a través de la membrana (Iwao y Jaffe 1989). Un bloqueo eléctrico de la polispermia también se produce en ranas (Cross y



D

Na^+ (m*M*)	Porcentaje de células huevo (cigotos) polispérmicas
490	22
360	26
120	97
50	100

Fig. 7-22. Potencial de membrana del óvulo del erizo de mar antes y después de la fecundación. **A.** Antes del agregado de espermatozoides, la diferencia de potencial a través de la membrana plasmática es cerca de -70 mV. Dentro de 1-3 segundos después de que el espermatozoide fecundado contacta con el óvulo, el potencial cambia en dirección positiva. **B, C.** Huevos (en estadio de cigoto) de *Lytechinus* fotografiados durante la primera segmentación. **B.** Huevos control desarrollándose en Na^+ 490 m*M*. **C.** Polispermia en óvulos fecundados en similares concentraciones elevadas de espermatozoides en Na^+ 120 m*M* (la colina fue sustituida por sodio). **D.** Cuadro que muestra el aumento de la polispermia con la disminución de la concentración del ion sodio. (De Jaffe 1980; fotografías cortesía de L. A. Jaffe.)

Elinson 1980), pero probablemente no suceda en la mayoría de los mamíferos (Jaffe y Cross 1983).

EL BLOQUEO LENTO DE LA POLISPERMIA. Los gametos femeninos (óvulos) de erizos de mar (y de muchos otros animales) tienen un segundo bloqueo de la polispermia, denominado **bloqueo lento de la polispermia** el cual permite impedir el ingreso de múltiples espermatozoides al citoplasma del cigoto (óvulo recién fecundado) (Just 1919). El bloqueo rápido de la polispermia es pasajero, debido a que el potencial de membrana del óvulo del erizo de mar se mantiene positivo por solo cerca de un minuto. Este breve cambio de potencial no es suficiente para impedir la polispermia de manera permanente, y la polispermia puede producirse todavía si los espermatozoides unidos a la membrana vitelina no han sido eliminados de algún modo (Carroll y Epel 1975). Esta eliminación es llevada a cabo por la **reacción de los gránulos corticales (o reacción cortical)**, un bloqueo mecánico para la polispermia más lento que llega a ser activo cerca de un minuto después de la primera fusión exitosa entre el espermatozoide y el gameto femenino.

Directamente por debajo de la membrana celular del óvulo del erizo de mar se encuentran cerca de 15.000 gránulos corticales, cada uno de aproximadamente 1 μm de diámetro (véase fig. 7-6B). Al producirse el ingreso del contenido del espermatozoide, estos gránulos corticales se fusionan con la membrana celular del gameto femenino recién fecundado y liberan sus contenidos en el espacio entre la membrana celular y el material fibroso de las proteínas de la membrana vitelina. Varias proteínas son liberadas por esta exocitosis de los gránulos corticales. La primera es una proteasa tipo tripsina denominada **serino proteasa de los gránulos corticales**. Esta enzima disuelve los "postes" proteicos que conectan a las proteínas de la membrana vitelina con la membrana celular, y modifican a los receptores de bindina y despojan a cualquier espermatozoide unido a ellos (Vacquier y col. 1973; Glabe y Vacquier 1978; Haley y Wessel 1999). En segundo lugar, los mucopolisacáridos liberados por los gránulos corticales producen un gradiente osmótico que provoca una corriente de agua hacia el espacio entre la membrana celular y la membrana vitelina, haciendo que la membrana vitelina se expanda y llegue a ser la **membrana de fecundación** (también conocido como espacio de fecundación) (figs. 7-23 y 7-24). Una tercera proteína liberada por los gránulos corticales, una enzima peroxidasa, endurece la membrana de fecundación al enlazar residuos de tirosina sobre proteínas adyacentes (Foerder y Shapiro 1977; LaFleur y col. 1998). Como se muestra en la figura 7-23, la membrana de fecundación se comienza a formar en el sitio de entrada del espermatozoide y continúa su expansión alrededor del gameto femenino recién fecundado. Cuando ésta se forma los espermatozoides unidos son liberados de la envoltura. Este proceso comienza unos 20 segundos después de la unión del espermatozoide y se completa al finalizar el primer minuto de iniciada la fecundación. Por último, un cuarto grupo de proteínas de los gránulos corticales, incluida la **hialina**, forman una cubierta alrededor del cigoto (Hylander y Summers 1982). Los cigotos extienden microvellosidades alargadas cuyos extremos se unen a esta **capa hialina.** Esta capa proporciona soporte para las blastómeras durante la segmentación.

SITIO WEB 7.5 **Construcción de la matriz extracelular de los cigotos (Building the egg's extracellular matrix).** En los erizos de mar, los gránulos corticales secretan no solo hialina sino un número de proteínas que construyen la matriz extracelular del embrión. Estos procesos sumamente coordinados tienen como resultado capas secuenciales.

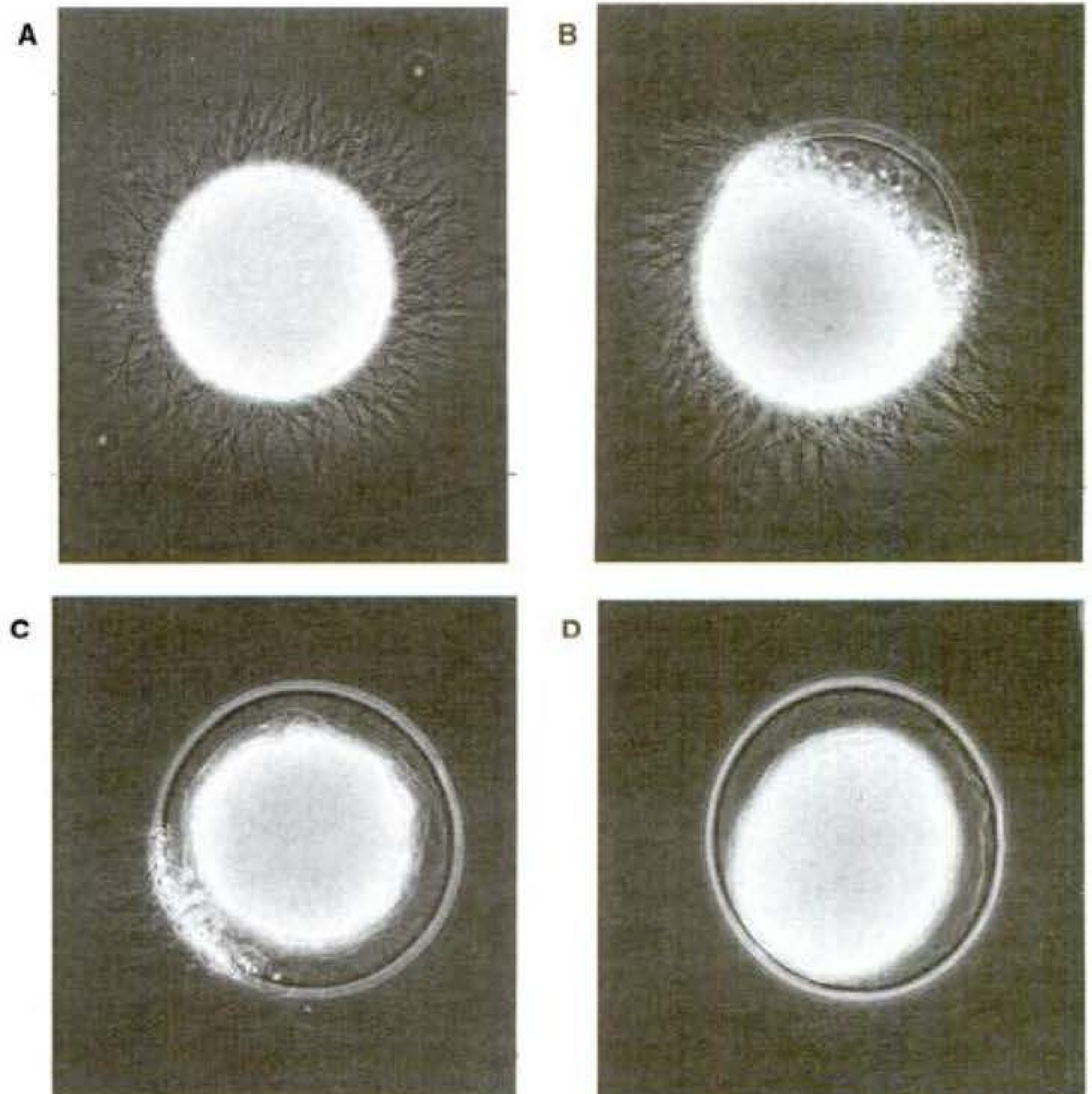


Fig. 7-23. Formación de la membrana de fecundación y eliminación del exceso de espermatozoides. Para crear estas fotografías, fueron agregados espermatozoides a los óvulos de erizo de mar, y la suspensión fue fijada en formaldehído para evitar reacciones posteriores. **A.** A los 10 segundos luego de haber sido agregados los espermatozoides, los espermatozoides son observados alrededor del óvulo. **B, C.** A los 25 y 35 segundos después de la inseminación, se forma una membrana de fecundación alrededor del óvulo, comenzando en el punto de ingreso del contenido del espermatozoide. **D.** Se ha completado la membrana de fecundación y los espermatozoides han sido eliminados. (De Vacquier y Payne 1973; fotografías cortesía de V. D. Vacquier.)

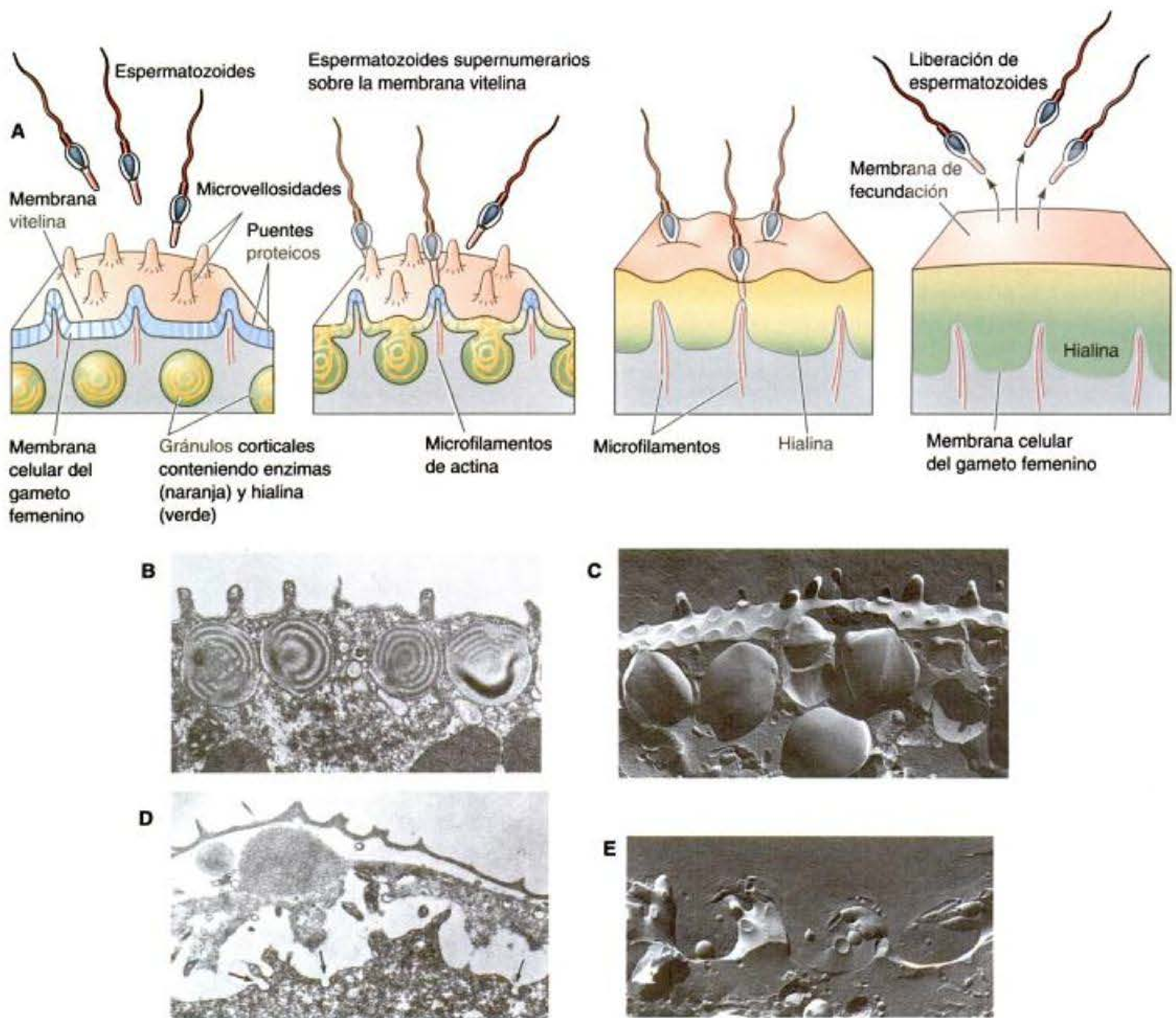


Fig. 7-24. Exocitosis de los gránulos corticales. **A.** Diagrama esquemático que muestra los acontecimientos que llevan a la formación de la membrana de fecundación y de la capa de hialina. Cuando los gránulos corticales experimentan exocitosis, liberan proteasas que rompen las proteínas que unen la membrana vitelina a la membrana celular. Los mucopolisacáridos liberados por los gránulos corticales forman un gradiente osmótico, haciendo de este modo que el agua ingrese e hinche el espacio entre la membrana vitelina y la membrana plasmática. Otras enzimas liberadas desde los gránulos corticales endurecen la membrana vitelina (ahora la membrana de fecundación) y libera a los espermatozoides unidos a ésta. **B, C.** Microfotografías electrónicas de barrido y transmisión de la corteza de un óvulo de erizo de mar sin fecundar. **D, E.** Microfotografías electrónicas de barrido y de transmisión de la misma región de un óvulo recientemente fecundado, que muestran el aumento de la membrana de fecundación y los puntos en los que los gránulos corticales se han fusionado con la membrana plasmática del óvulo (flechas en **D**). (**A**, según Austin 1965; **B-E**, de Chandler y Heuser 1979, fotografías cortesía de D. E. Chandler.)

VADE MECUM[2] **Fecundación en el erizo de mar (Sea urchin fertilization).** Las destacables reacciones que impiden la polispermia en un óvulo de erizo de mar fecundado pueden ser vistas en el levantamiento de la membrana de fecundación. Este segmento contiene películas de estos eventos mostrados en tiempo real.
[Hacer clic sobre Sea Urchin]

En mamíferos, la reacción de los gránulos corticales no genera una membrana de fecundación, pero su efecto final es el mismo. Las enzimas liberadas modifican a los receptores de espermatozoides de la zona pelúcida de modo tal que ellos no pueden permanecer unidos por mucho más tiempo (Bleil y Wassarman 1980). Se ha visto que los gránulos corticales de los ovocitos II de ratón contienen la enzima *N*-acetilglucosaminidasa capaz de fragmentar a la *N*-acetilglucosamina de la cadena de hidratos de carbono de la ZP3. La *N*-acetilglucosamina es uno de los grupos de hidratos de carbono a los que se une el espermatozoide. Miller y col. (1992, 1993) han demostrado que cuando los residuos de *N*-acetilglucosamina son eliminados en la fecundación, ZP3 no servirá por más tiempo como sustrato para la unión de otros espermatozoides. ZP2 es fragmentada por otra proteasa del

gránulo cortical, y ésta también pierde su capacidad para unir espermatozoides (Moller y Wassarman 1989). Por lo tanto, una vez que el contenido de un espermatozoide ha ingresado al gameto femenino, otros espermatozoides no pueden iniciar o mantener su unión a la zona pelúcida y son liberados rápidamente.

EL CALCIO COMO INICIADOR DE LA REACCIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES. El mecanismo de la reacción de los gránulos corticales (reacción cortical) es semejante al de la reacción acrosómica, y puede involucrar a las mismas moléculas. En el momento de la fecundación, la concentración de Ca^{2+} libre intracelular del gameto femenino aumenta de modo considerable. En este ambiente con calcio aumentado, las membranas de los gránulos corticales se fusionan con la membrana celular del gameto femenino recién fecundado, liberando sus contenidos (véase fig. 7-24). Una vez que comienza la fusión de los gránulos corticales cerca del punto del ingreso del espermatozoide, se propaga una onda de exocitosis de gránulos corticales alrededor de la corteza hacia el lado opuesto del gameto femenino recién fecundado.

En los erizos de mar y en los mamíferos, el aumento en la concentración de calcio responsable de la reacción cortical no es debido a un ingreso de calcio hacia el gameto femenino recién fecundado, en su lugar éste viene desde el interior mismo del gameto femenino. La liberación de calcio a partir del almacenamiento intracelular puede ser monitoreada visualmente utilizando marcadores luminiscentes activados por calcio tal como el de aequorin (aislada a partir de una medusa luminiscente) o marcadores fluorescentes tales como el de fura-2. Estos marcadores emiten luz cuando se unen a Ca^{2+} libre. Cuando un óvulo de erizo de mar es inyectado con alguno de estos marcadores y luego fecundado, una llamativa onda de liberación de calcio se propaga a través del óvulo (fig. 7-25). Comenzando en el punto del ingreso del espermatozoide, una banda de luz atraviesa la célula (Steinhardt y col. 1977; Gilkey y col. 1978; Hafner y col. 1988). No se produce una simple difusión de los iones de calcio a través del cigoto a partir del punto de ingreso del espermatozoide. En su lugar, la liberación de Ca^{2+} comienza en un extremo de la célula y continúa activamente hacia el otro extremo. La liberación de Ca^{2+} en su totalidad se completa en aproximadamente 30 segundos en los erizos de mar, y el Ca^{2+} libre es secuestrado nuevamente poco después de haber sido liberado. Si dos espermatozoides ingresan al citoplasma del gameto femenino, se puede ver el comienzo de la liberación de Ca^{2+} en dos puntos de entrada sobre la superficie celular (Hafner y col. 1988).

Varios experimentos han demostrado que los iones de calcio son directamente responsables de la propagación de la reacción granular cortical, y que estos iones son almacenados dentro del mismo gameto femenino. La droga A23187 es un ionóforo de calcio (un compuesto que transporta Ca^{2+} libre a través de las membranas lipídicas, que le permite a estos cationes cruzar ba-

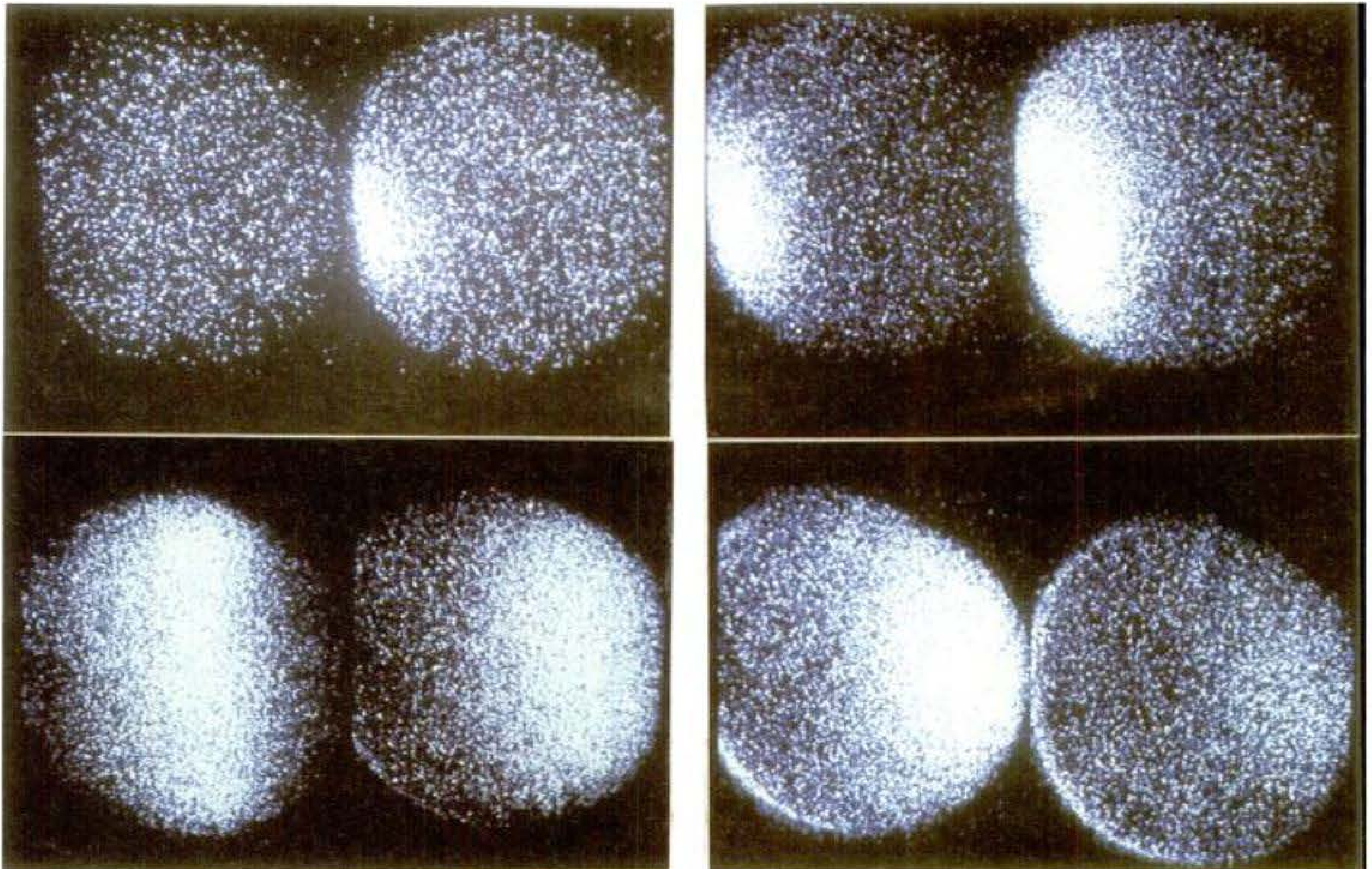
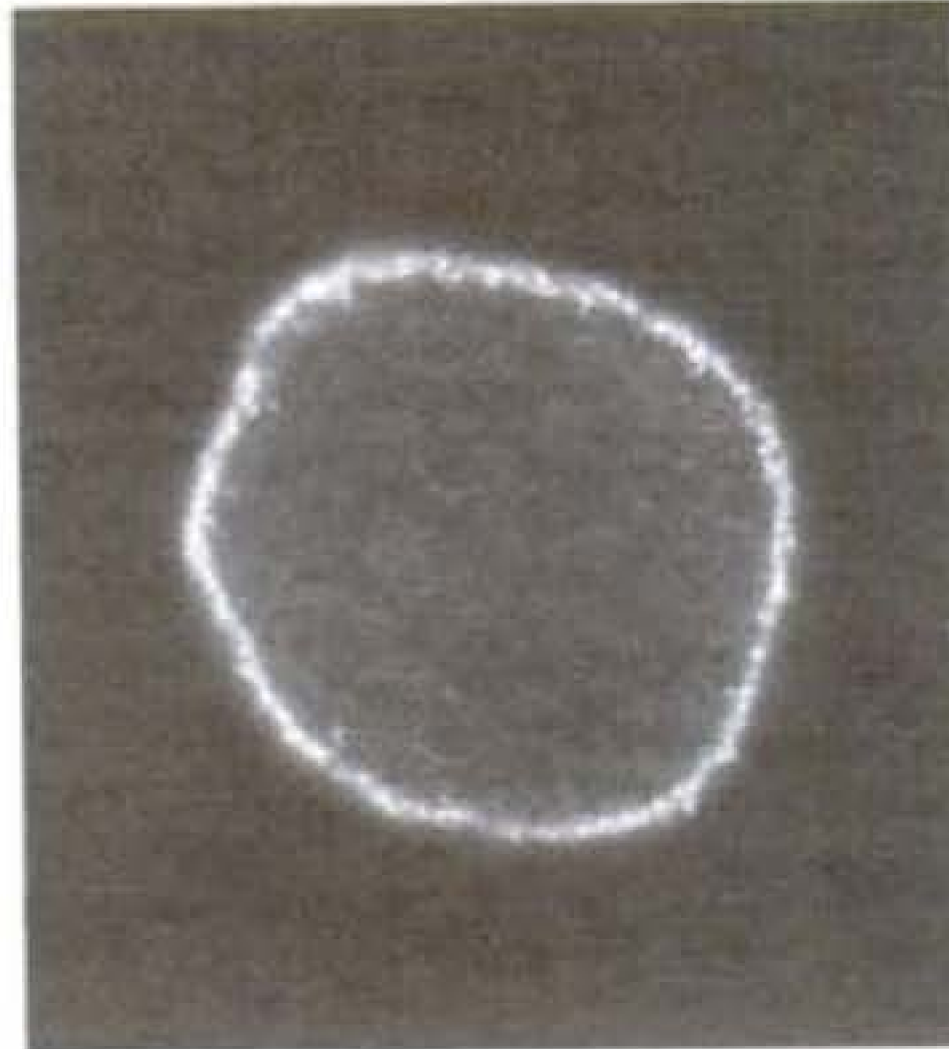


Fig. 7-25. Ondas de liberación de calcio a través de los óvulos de erizo de mar durante la fecundación. Un óvulo de erizo de mar es cargado previamente con marcador que fluoresce cuando éste se une al calcio. Cuando un espermatozoide se fusiona con el óvulo, se puede ver una onda de liberación de calcio, que comienza en el sitio de entrada del espermatozoide y se propaga a través del óvulo. Las ondas tardan 30 segundos en atravesar el óvulo. (Fotografía cortesía de G. Schatten.)





A B

Fig. 7-26. Retículo endoplasmático rodeando a los gránulos corticales en los óvulos de los erizos de mar. **A.** El retículo endoplasmático ha sido teñido con osmio-zinc iodado para permitir la visualización mediante microscopía electrónica de transmisión. El gránulo cortical se ve rodeado por retículo endoplasmático. **B.** Un óvulo entero teñido con anticuerpo fluorescente para canales que liberan calcio dependientes de calcio. Los anticuerpos muestran a estos canales en el retículo endoplasmático cortical. (**A**, de Luttmer y Longo 1985; fotografía cortesía de S. Luttmer; **B**, de McPherson y col. 1992, fotografía cortesía de F. J. Longo.)

rreras por otra parte impermeables). Colocando óvulos de erizo de mar sin fecundar en agua de mar conteniendo A23187 se produce la reacción de los gránulos corticales y la elevación de la membrana de fecundación. Además, esta reacción se produce en ausencia de Ca^{2+} en el agua que los rodea. Por esta razón, el A23187 debe causar la liberación de Ca^{2+} que en realidad está secuestrado en las organelas dentro del óvulo (Chambers y col. 1974; Steinhardt y Epel 1974). Los gránulos corticales son adheridos a la membrana celular por una serie de proteínas integrales de membrana que facilitan la exocitosis mediada por calcio (Conner y col. 1997; Conner y Wessel 1998).

En erizos de mar y en vertebrados (pero no en caracoles y gusanos), los iones de calcio responsables de la reacción de los gránulos corticales están almacenados en el retículo endoplasmático del gameto femenino (Eisen y Reynolds 1985; Terasaki y Sardet 1991). En erizos de mar y ranas, este retículo es voluminoso en la corteza y rodea a los gránulos corticales (fig. 7-26; Gardiner y Grey 1983; Luttmer y Longo 1985). En *Xenopus*, el retículo endoplasmático cortical llega a ser diez veces más abundante durante la maduración del gameto femenino y desaparece localmente dentro de un minuto luego de la onda de exocitosis de los gránulos corticales. Una vez iniciada, la liberación de Ca^{2+} se autopropaga. El calcio libre es capaz de liberar calcio secuestrado desde sus sitios de almacenamiento, provocando así una onda de liberación de Ca^{2+} y de exocitosis de los gránulos corticales.

SITIO WEB 7.6 **Bloqueo de la polispermia (Blocks to polyspermy).** El análisis de la polispermia de Theodor Boveri es un clásico de la embriología descriptiva y experimental. La definición de E. E. Just de un bloqueo rápido y uno lento fue una publicación científica de importancia fundamental en embriología. Ambas publicaciones científicas son aquí reimpresas, junto con comentarios.

VADE MECUM². **E. E. Just (E.E. Just).** Esta sección contiene videos de los trabajos de Just sobre la fecundación del erizo de mar. **[Hacer clic sobre Sea Urchin]**

La activación del metabolismo del cigoto

Aunque la fecundación es con frecuencia descrita simplemente como el medio para fusionar dos núcleos haploides, tiene un papel igualmente importante en iniciar el proceso que da comienzo al desarrollo. Estos eventos suceden en el citoplasma y tienen lugar dentro de los núcleos involucrados.*

El óvulo de erizo de mar maduro es una célula metabolicamente inactiva que es activada por el espermatozoide. Esta activación es simplemente un estímulo, sin embargo; pone en acción a un grupo preprogramado de eventos metabólicos. Las respuestas del óvulo al espermatozoide pueden ser divididas en respuestas "tempranas", que se producen dentro de los segundos de la reacción de los gránulos corticales, y la respuesta "tardía", que tiene lugar varios minutos después de comenzada la fecundación† (cuadro 7-1; fig. 7-27).

Respuestas tempranas

Como se ha visto, el contacto o la fusión entre el espermatozoide y el óvulo del erizo de mar activa los dos blo-

* En ciertas salamandras, esta función del desarrollo ha sido totalmente divorciada de la función genética. La salamandra plateada (*Ambystoma platineum*) es una subespecie híbrida que consiste únicamente de hembras. Cada hembra produce un huevo (gameto femenino) con un número cromosómico sin reducir. Este huevo, sin embargo, no puede desarrollarse por sí mismo, de modo tal que la salamandra plateada se aparea con un macho de salamandra Jefferson (*A. jeffersonianum*). El espermatozoide del macho de salamandra Jefferson solo estimula el desarrollo del huevo; sin contribuir con el material genético (Uzzell 1964). Para detalles de este complejo mecanismo de procreación, véase Bogart y col. 1989.

† *Nota del traductor:* una vez producida la fecundación y por lo tanto, una vez establecido el contacto y fusión entre el espermatozoide y el gameto femenino, el producto resultante se denomina célula huevo o cigoto. Sería inapropiado hablar de gameto femenino u óvulo ya que cuenta con los componentes nucleares y citoplasmáticos del espermatozoide. Sería correcto decir que es un huevo en estadio de cigoto o de célula huevo.

Cuadro 7-1 *Acontecimientos de la fecundación del erizo de mar*

Acontecimiento	*Tiempo aproximado luego de la inseminación*[a]
RESPUESTAS TEMPRANAS	
Unión espermatozoide-óvulo	0 segundos
Aumento del potencial de fecundación (bloqueo rápido de la polispermia)	dentro del seg
Fusión de las membranas espermatozoide-óvulo	dentro del seg
Detección del primer incremento de calcio	10 seg
Exocitosis de los gránulos corticales (bloqueo lento de la polispermia)	15-60 seg
RESPUESTAS TARDÍAS	
Activación de la cinasa NAD	comienza al min 1
Incremento en $NADP^+$ y NADPH	comienza al min 1
Incremento en el consumo de O_2	comienza al min 1
Entrada del espermatozoide	1-2 min
Salida de ácidos	1-5 min
Incremento en el pH (se mantiene elevado)	1-5 min
Descondensación de la cromatina del espermatozoide	2-12 min
Migración del núcleo del espermatozoide hacia el centro del óvulo	2-12 min
Migración del núcleo del óvulo hacia el núcleo del espermatozoide	5-10 min
Activación de la síntesis de proteínas	comienza a los 5-10 min
Activación del transporte de aminoácidos	comienza a los 5-10 min
Comienzo de la síntesis de DNA	20-40 min
Mitosis	60-80 min
Primera segmentación	85-95 min

Principales fuentes: Whitaker y Steinhardt 1985; Mohri y col. 1995.
[a] Tiempos aproximados basados sobre datos de *S. purpuratus* (15°C-17°C), *L. pictus* (16°C-18°C), *A. punctulata* (18°C-20°C) y *L. variegatus* (22°C-24°C). El tiempo de los acontecimientos dentro del primer minuto es mejor conocido para *Lytechinus variegatus*, de modo tal que estos tiempos están enumerados para estas especies.

queos principales de la polispermia: el bloqueo rápido, iniciado por el ingreso de sodio a la célula; y el bloqueo lento, iniciado por la liberación de Ca^{2+} intracelular. La activación de todos los cigotos parece ser dependiente de un aumento en la concentración del Ca^{2+} libre dentro del cigoto. La misma liberación de Ca^{2+} responsable de la reacción de los gránulos corticales es también responsable del reingreso del cigoto en el ciclo celular y de la reactivación de la síntesis de proteínas en el cigoto. Los niveles de Ca^{2+} en el cigoto se incrementan desde 0.1 a 1 μM, y en la mayoría de las especies, se produce como una onda o sucesiones de ondas que se mueven a través del cigoto comenzando en el sitio de fusión del espermatozoide con el gameto femenino (Jaffe 1983; Terasaki y Sardet 1991; véase fig. 7-25).

En mamíferos, varias ondas de calcio atraviesan al cigoto. Estudios recientes por Ducibella y colegas (2002) han demostrado que las diferentes funciones de la activación del cigoto son iniciadas en números diferentes de ondas de calcio. Además, los eventos que son *iniciados* por una onda de calcio podrían no ser finalizados sin ondas de calcio adicionales.

La presencia de Ca^{2+} es esencial para activar el desarrollo del embrión. Si se inyecta el químico quelante de calcio EGTA en los óvulos de erizo de mar, no se produce la reacción cortical, no hay cambios en el potencial de reposo de membrana, y no se reinicia la división celular al momento de la fecundación (Runft y col. 2002). Por el contrario, los óvulos pueden ser activados artificialmente ante la ausencia de espermatozoides mediante procedimientos que liberan calcio libre en el ovocito. Steinhardt y Epel (1974) encontraron que la inyección de cantidades micromolares del ionóforo de calcio A23187 en el óvulo de erizo de mar provocaba la mayoría de las respuestas características de un óvulo normalmente fecundado. Se produce una elevación de la membrana de fecundación, un aumento del pH intracelular, una explosiva utilización de oxígeno y un incremento en la síntesis de proteínas y de DNA. En la mayoría de los casos, el desarrollo se detiene antes de la primera mitosis, debido a que el óvulo es todavía haploide y carece del centríolo del espermatozoide necesario para la división.

La liberación de calcio activa a una serie de reacciones metabólicas (fig. 7-27). Una de éstas es la activación de la enzima NAD^+ cinasa, que convierte NAD^+ en $NADP^+$ (Epel y col. 1981). Este cambio puede tener importantes consecuencias para el metabolismo de los lípidos, debido a que $NADP^+$ (pero no NAD^+) puede ser utilizada como coenzima para la biosíntesis de lípidos. Por lo tanto, la conversión de NAD^+ a $NADP^+$ puede ser importante en la construcción de muchas membranas celulares nuevas requeridas durante la segmentación. El calcio liberado también afecta el consumo de oxígeno. Durante la fecundación se observa una explosiva reducción del oxígeno (a peróxido de hidrógeno), y la mayor parte de esta "explosión respiratoria" es utilizada para entrelazar la membrana de fecundación. La enzima responsable de esta reducción de oxígeno es también dependiente de NADPH (Heinecke y Shapiro 1989). Por último, NADPH ayuda a regenerar glutatión y ovotiol, que son cruciales para barrer radicales libres que de otro modo podrían dañar al DNA del cigoto y del embrión temprano (Mead y Epel 1995).

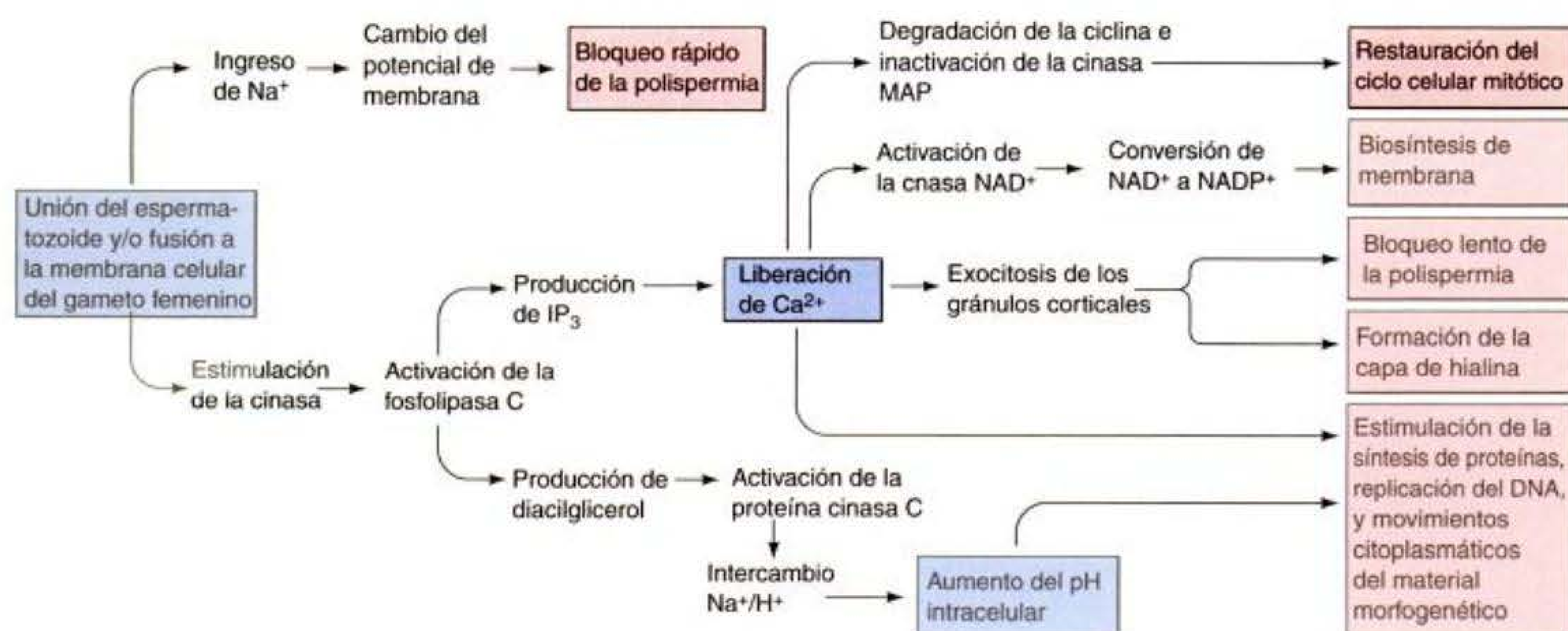


Fig. 7-27. Modelo de una vía postulada para la activación del óvulo en el erizo de mar. (Después de Epel 1980 y L. A. Jaffe, comunicación personal.)

Información adicional y especulaciones

La activación del metabolismo del cigoto

En 1937, el embriólogo de Yale Ross Harrison lamentó: "Ahora se ha establecido la relación entre la genética y la embriología, pero ¿se puede decir lo mismo de la embriología y la fisiología? Quizás estamos todavía bajo el encantamiento de la doctrina en la que más de un enlace a la vez es pecado". En efecto, para todo nuestro conocimiento sobre los genes que instruyen al embrión, los mecanismos fisiológicos por los cuales las instrucciones son llevadas a cabo han sido largamente ignorados. Esta situación está cambiando a medida que nuestro conocimiento sobre las señales de las vías llega a ser integrado con nuestro conocimiento sobre el citoesqueleto y de los canales iónicos de membrana. Uno de los lugares más apasionantes de la integración involucra a los mecanismos iónicos de fecundación.

IP_3: Liberador de iones de calcio

Una década atrás, Berridge (1993) señaló que "Cómo el espermatozoide dispara la explosiva liberación de calcio en el gameto femenino tiene todavía algo de misterio." Todavía no se conoce el mecanismo por el cual la unión del espermatozoide y del gameto femenino inicia una masiva liberación de Ca^{2+}. Sin embargo, una conclusión a la que se ha llegado es que la producción de **inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)** es el mecanismo primario para la liberación de Ca^{2+} desde el almacenamiento intracelular. La vía de IP_3 es mostrada en la figura 7-28. El **fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)** de la membrana es escindido por la enzima **fosfolipasa C (PLC)** para producir dos compuestos activos: IP_3 y **diacilglicerol (DAG).** IP_3 es capaz de liberar Ca^{2+} en el citoplasma mediante la apertura de canales del Ca^{2+} del retículo endoplasmático. DAG activa a la **proteína cinasa C**, que a su vez activa a una proteína que intercambia iones sodio por iones hidrógeno, aumentando el pH del cigoto (Swann y Whitaker 1986; Nishizuka 1986). Esta bomba de intercambio Na^+/H^+ también necesita Ca^{2+} para su actividad. El resultado de la activación de la PLC es por lo tanto la liberación de Ca^{2+} y la alcalinización del cigoto, y ambos de estos compuestos creados, IP_3 y DAG, están involucrados en el comienzo del desarrollo.

IP_3 en los óvulos de erizo de mar se forma en el sitio de entrada del espermatozoide y puede ser detectado dentro de segundos del comienzo de su fecundación. La inhibición de la síntesis de IP_3 impide la liberación de calcio (Lee y Shen 1998; Carroll y col. 2000), mientras que IP_3 inyectado puede liberar Ca^{2+} secuestrado en los óvulos de erizo de mar, llevando a la reacción cortical (Whitaker e Irvine 1984; Busa y col. 1985). Además, estos efectos mediados por IP_3 pueden frustrarse por la inyección previa de los gametos femeninos con agentes quelantes de calcio (Turner y col. 1986).

Canales del calcio sensibles a IP_3 han sido hallados en el retículo endoplasmático de los gametos femeninos. Se piensa que el IP_3 formado en el sitio de entrada del espermatozoide se une a los receptores de IP_3 de estos canales, efectuando una liberación local de calcio (Ferris y col. 1989; Furuichi y col. 1989; Terasaki y Sardet 1991). Una vez liberado, el Ca^{2+} puede difundir directamente, o éste puede facilitar la liberación de más Ca^{2+} mediante la unión a receptores sensibles al calcio localizados en el retículo endoplasmático cortical (McPherson y col. 1992).

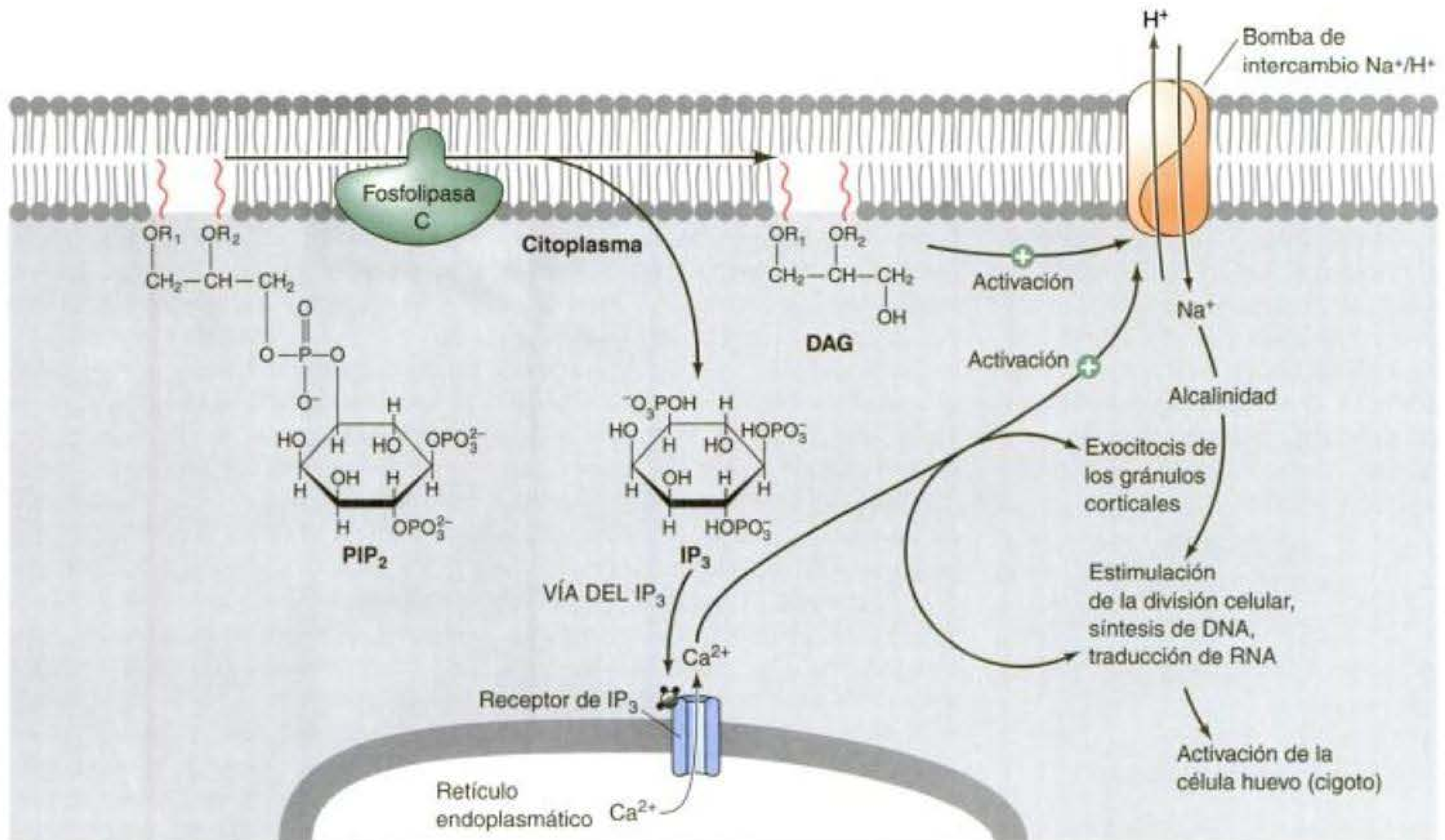


Fig. 7-28. Funciones de los fosfatos de inositol en la liberación de calcio del retículo endoplasmático y en el comienzo del desarrollo. La fosfolipasa C escinde al PIP_2 en IP_3 y DAG. El IP_3 libera calcio del retículo endoplasmático, y el DAG, con ayuda del Ca^{2+} liberado, activa en la membrana la bomba de intercambio Na^+-H^+.

La unión del Ca^{2+} a estos receptores libera más calcio y este calcio liberado se une a más receptores, y así sucesivamente. La onda de liberación de calcio resultante se propaga a través de la célula, comenzando en el punto de entrada del espermatozoide. Los gránulos corticales, que se fusionan con la membrana celular ante la presencia de elevadas concentraciones de calcio, responden con una onda de exocitosis que sigue a la del Ca^{2+}. Mohri y col. (1995) han demostrado que el Ca^{2+} liberado por IP_3 es necesario y suficiente para iniciar la onda de liberación de calcio.

Se ha encontrado de manera semejante que IP_3 libera Ca^{2+} en los gametos femeninos de vertebrados. Como en los erizos de mar, se piensa que los ondas de IP_3 median la liberación de calcio a partir de sitios dentro del retículo endoplasmático (Miyazaki y col. 1992; Ducibella y col. 2002). Bloqueando el receptor de IP_3 en ovocitos II de hámster y ratón se impide la liberación de calcio en la fecundación. Xu y col. (1994) hallaron que bloqueando la liberación de calcio mediada por IP_3 se bloqueaba cada uno de los aspectos de la activación del ovocito II inducida por el espermatozoide, incluida la exocitosis de los gránulos corticales, el reclutamiento de mRNA y el reinicio del ciclo celular.

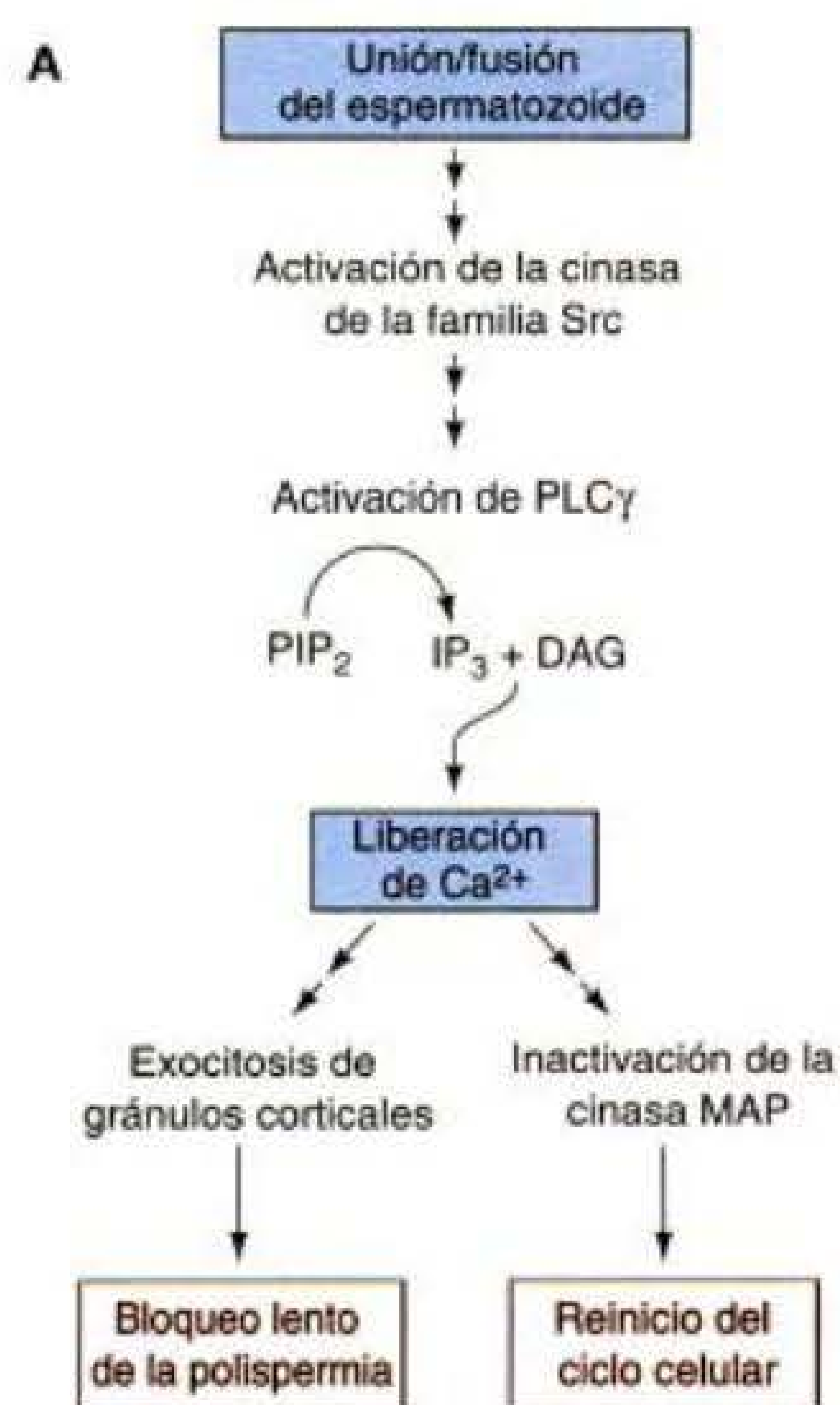
Fosfolipasa C: generador de IP_3

La pregunta luego llega a ser, ¿qué inicia la producción de IP_3? En otras palabras, ¿qué activa a las enzimas fosfolipasas C? Esta pregunta no ha sido fácil de tratar, debido a: 1) que hay numerosos tipos de PLC, 2) ellas pueden ser activadas a través de distintas vías y 3) diferentes especies pueden usar distintos mecanismos para activarlas. Los resultados a partir de estudios recientes de óvulos de erizos de mar sugieren que la PLC en este grupo de animales es un miembro de la famila g (gama) de las PLC (Carroll y col. 1997, 1999; Shearer y col. 1999). Los inhibidores que bloquean específicamente a esta familia de PLCs inhiben la producción de IP_3 así como la liberación de Ca^{2+}. Además, estos inhibidores pueden ser burlados por la microinyección de IP_3 en el gameto femenino. El mecanismo por el cual es generado IP_3 en vertebrados es ampliamente desconocido, pero podría involucrar a activadores citoplasmáticos que vienen junto con el núcleo del espermatozoide (Kuretake y col. 1996; Perry y col. 2000).

Cinasas: ¿conexión entre el espermatozoide y la PLC?

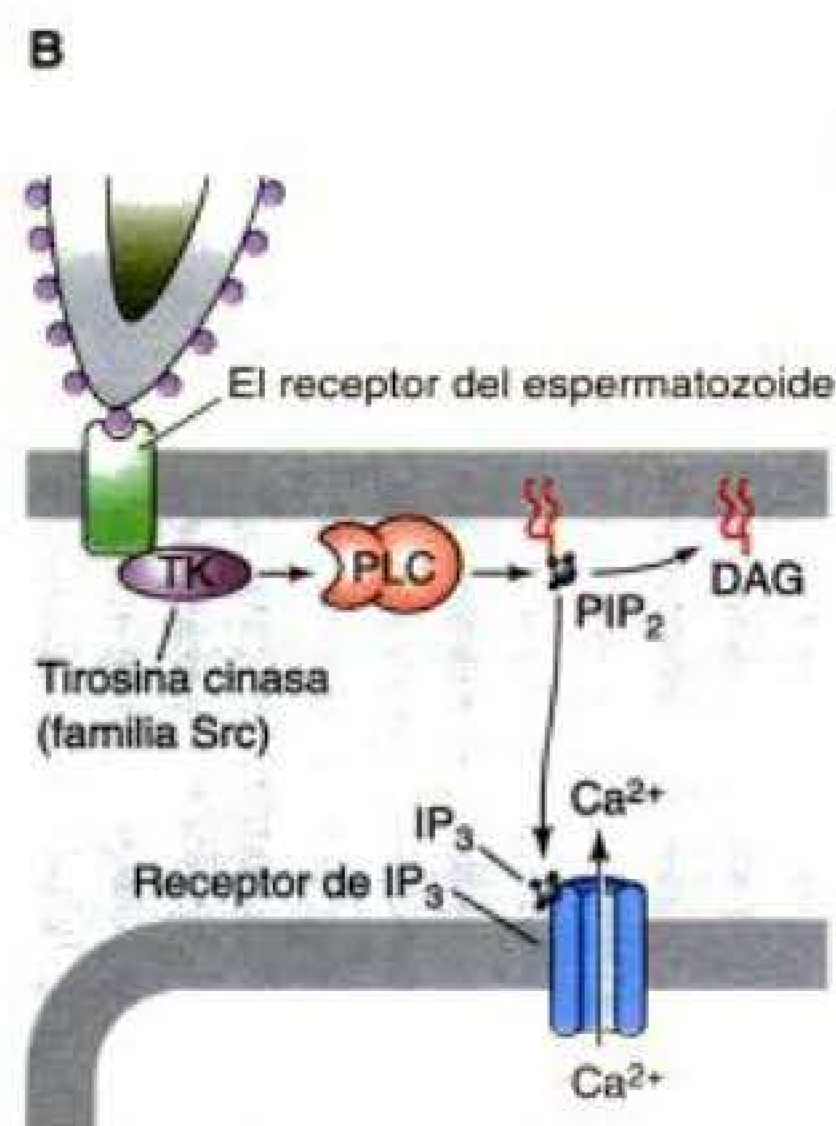
El hallazgo que la PLC clase γ era la responsable de la generación de IP_3 durante la fecundación de equinodermos llevó a los investigadores a estudiar las proteínas que activaban esta clase de fosfolipasas. Este trabajo rápidamente se enfocó sobre la familia de proteínas cinasas Src. Las proteínas Src son halladas en el citoplasma cortical de los gametos femeninos del erizo de mar y de las estrellas de mar, y tales proteínas pueden formar un complejo con la PLCγ. La inhibición de la proteína cinasa Src disminuyó y demoró la cantidad de calcio liberado (Giusti y col. 1999a,b; Kinsey y Shen 2000).

Una posibilidad es que el complejo PLCγ-Src sea conectado y activado por el receptor del espermatozoide en la membrana celular del gameto femenino (fig. 7-29B). Una segunda posibilidad es que la activación de la vía IP_3 no sea causada por la unión del espermatozoide y el gameto femenino, sino por la fusión de la membrana celular del espermatozoide y del gameto femenino. McCulloh y Chambers (1992) tienen evidencia electrofisiológica que indica que la activación del cigoto del erizo de mar no se produce hasta después de haberse unido los citoplasmas del espermatozoide y del óvulo. Ellos sugirieron que los componentes que activan al cigoto están localizados sobre la membrana celular del espermatozoide o en el citoplasma del espermatozoide. Es incluso posible que cuando se produce la fusión de las membranas de los gametos, los receptores cinasas de los espermatozoides o las PLC (activados por la capa gelatinosa del óvulo para iniciar la reacción acrosómica) activen la cascada de IP_3 resultando en la liberación de calcio en el cigoto (véase Gilbert 1994). En este panorama, mostrado en la figura 7-29C, la bindina sirve para la adhesión célula-célula y la fusión de membrana, pero no para señalizar. En su lugar, el cigoto "se activa" a través del espermatozoide. Hay evidencia en mamíferos que PLC soluble de espermatozoides puede ser suficiente para iniciar la liberación de calcio en ovocitos, pero los datos son difíciles de interpretar debido a las concentraciones de inhibidores y activadores que fueron utilizadas (véase Runft y col. 2002).



Hipótesis del activador soluble pequeño

Todavía otra posibilidad es que el agente activo en la liberación de calcio secuestrado sea una pequeña molécula del citosol del espermatozoide (fig. 7-29D). Tal molécula puede ser importante en la fecundación de mamíferos. El respaldo para esta hipótesis viene del procedimiento clínico de inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), utilizada para tratar la esterilidad cuando el recuento de espermatozoides en el hombre es bajo. En este procedimiento, un único espermatozoide humano intacto es inyectado directamente en el citoplasma del gameto femenino (véase fig. 21-2). La inyección da como resultado la activación del cigoto, la formación de un pronúcleo masculino, y el desarrollo embrionario normal (Van Steirtinghem 1994). Kimura y colegas (1998) han demostrado que cabezas aisladas de espermatozoides de ratón son capaces de activar a un ovocito de ratón, y que los componentes activos de la cabeza del espermatozoide parecen ser las proteínas que rodean al núcleo haploide. No se conoce qué papel pueden jugar estos componentes perinucleares en la fisiología normal de la activación del cigoto, pero un grupo reciente de experimentos llevados a cabo por Saunders y col. (2002) sugieren que el factor activo puede ser una forma novedosa de PLC específica de espermatozoides. Esta proteína, denominada PLCζ, dispara ondas de Ca^{2+} indistinguibles de aquellas de la fecundación



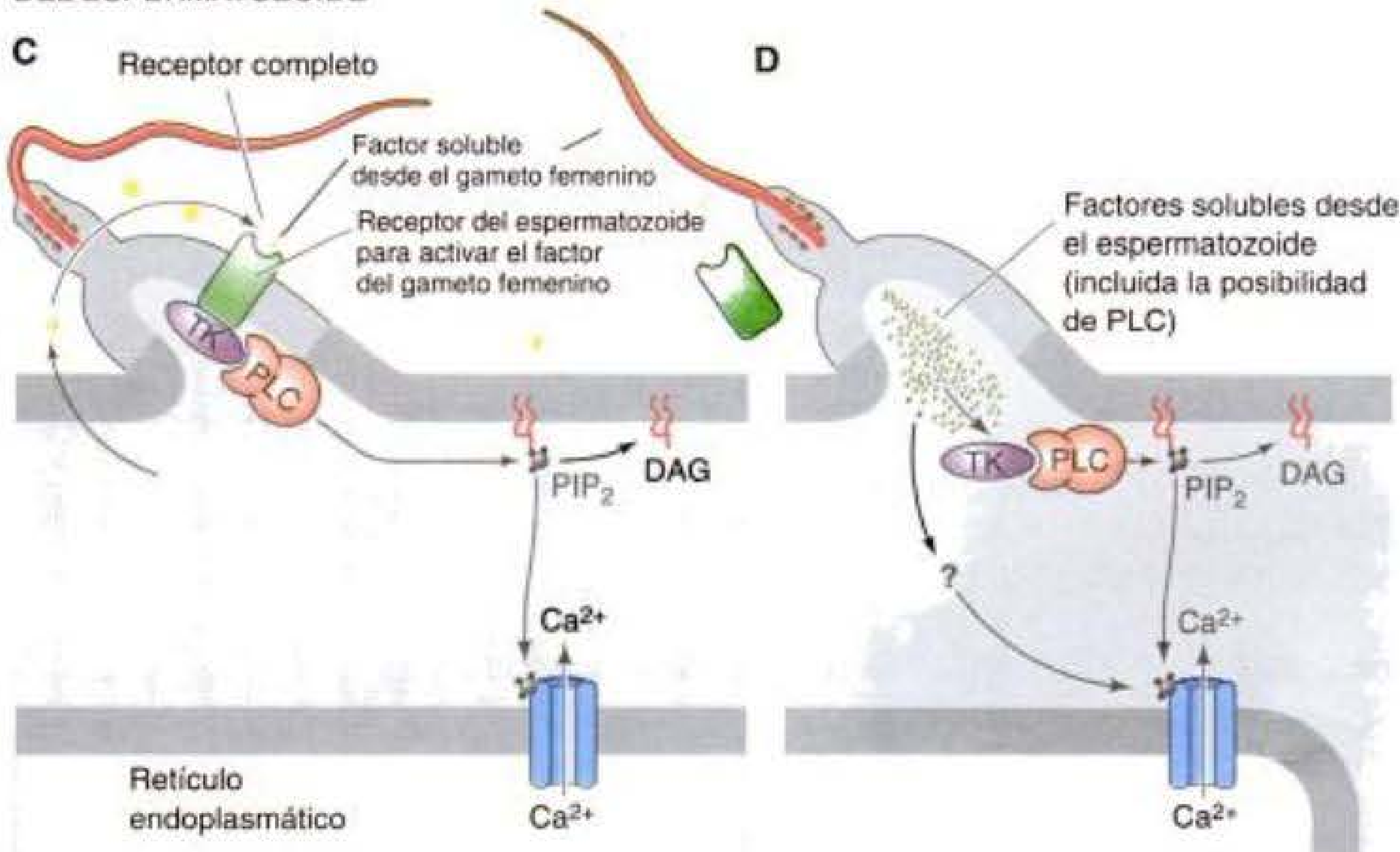


Fig. 7-29. Mecanismos posibles de la activación del cigoto. **A**. Un bosquejo esquemático de la activación del cigoto del erizo de mar. **B-D**. Mecanismos posibles por los cuales este esquema podría ser llevado a cabo. **B**. El receptor de bindina activa a una cinasa Src citoplasmática. **C**. Una cinasa Src activada o PLC en la membrana plasmática del espermatozoide activa a las vías del cigoto. **D**. Liberación de calcio y activación del cigoto por PLC activada del espermatozoide o una sustancia del espermatozoide que activa a la PLC del cigoto.

normal, y la eliminación de PLCζ de los extractos de espermatozoides de ratón impide la liberación de calcio en los cigotos.

Las diferentes especies han evolucionado distintos modos de obtención de Ca^{2+} durante la fecundación. También es posible que cualquier especie particular pueda usar más de un medio para iniciar la liberación de Ca^{2+} en la fecundación.

Respuestas tardías

Las respuestas tardías de la fecundación incluyen la activación de la síntesis de DNA y de la síntesis de proteínas. La fusión del óvulo y del espermatozoide en el erizo de mar causa el aumento de pH intracelular.* Esta elevación en el pH intracelular comienza con un segundo ingreso de iones de sodio, que generan el intercambio 1:1 entre los iones sodio del agua de mar y los iones hidrógeno del óvulo. La pérdida de los iones de hidrógeno lleva al aumento del pH del óvulo (Shen y Steinhardt 1978). Se piensa que el aumento del pH y la elevación del Ca^{2+} actúan conjuntamente para estimular la síntesis de nuevas proteínas y la síntesis de DNA (Winkler y col. 1980; Whitaker y Steinhardt 1982; Rees y col. 1995). Si se eleva experimentalmente el pH de un gameto femenino a un nivel similar al del gameto fecundado, sobreviene la síntesis de DNA y la envoltura nuclear desaparece, como si el gameto femenino estuviera fecundado (Miller y Epel 1999).

Los iones de Ca^{2+} son también de importancia fundamental para la síntesis de DNA. El Ca^{2+} activa a la enzima MAP cinasa, convirtiéndola desde una forma fosforilada (activa) a una defosforilada (inactiva). La inactivación de la MAP cinasa elimina una inhibición sobre la síntesis de DNA (Carroll y col. 2000). Por lo tanto, la onda de Ca^{2+} libre inactiva a la MAP cinasa, y puede reanudarse la síntesis de DNA.

En erizos de mar, se produce una explosión de síntesis de proteínas generalmente dentro de varios minutos después del ingreso del espermatozoide. Esta síntesis de proteínas no depende de la síntesis de nuevo mensajero de RNA; en su lugar, ésta utiliza mRNA que ya estaban presentes en el citoplasma del ovocito (fig. 7-30; véase cuadro 5-2). Estos mRNA codifican proteínas tales como histonas, tubulinas, actinas y factores morfogenéticos que son utilizados durante el desarrollo temprano. Tal explosión de síntesis de proteína puede ser inducida por la elevación artificial del pH del citoplasma utilizando iones de amonio (Winkler y col. 1980). Un mecanismo para este aumento global en la traducción de los mensajeros almacenados parece ser la liberación de inhibidores del mRNA. En el capítulo 5, se discutió sobre la maskina, un inhibidor de la traducción en los ovocitos de anfibio sin fecundar. En los erizos de mar, un inhibidor similar también se une al factor de iniciación de la traducción eIF4E e impide que se produzca la traducción. Sin embargo, al momento de la fecundación, la proteína que está unida a 4E llega a ser fosforilada y degradada, permitiendo la traducción de los mRNA almacenados en el erizo de mar (Cormier y col. 2001). Se piensa que una de las cinasas activadas en la fecundación es la responsable de la fosforilación de la proteína que se une a 4E.

* Esto es debido a la producción de diacilglicerol (como se mencionó anteriormente). Otra vez, la variación entre especies puede ser frecuente. En el cigoto mucho más pequeño de ratón, no hay aumento del pH luego de la fecundación. En el ratón, no hay un incremento espectacular en la síntesis de proteínas inmediatamente después de la fecundación (Ben-Yosef y col. 1996).

Fusión del material genético

Fusión del material genético en los erizos de mar

En los erizos de mar, el núcleo del espermatozoide entra al óvulo perpendicular a la superficie del óvulo. Después

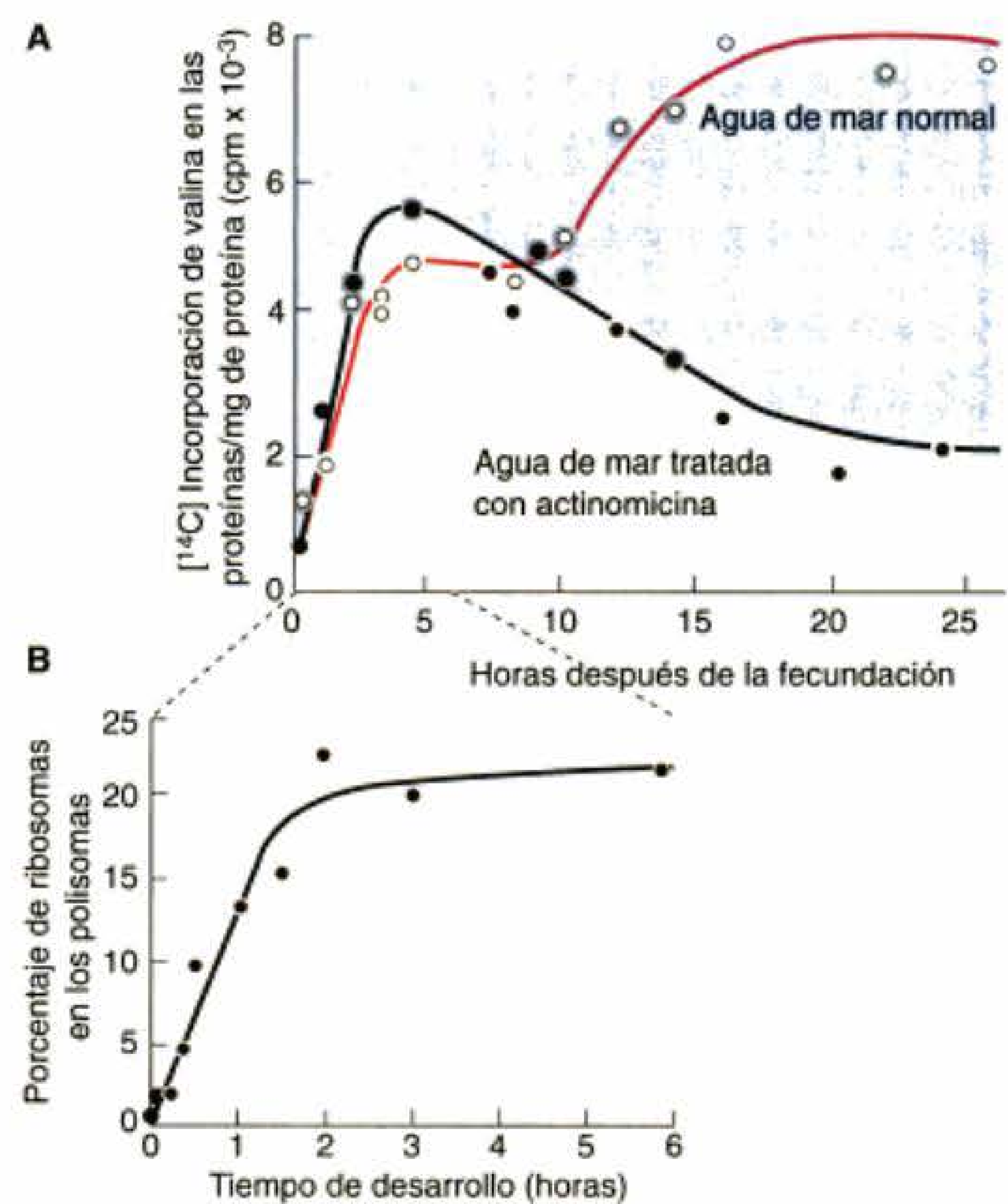


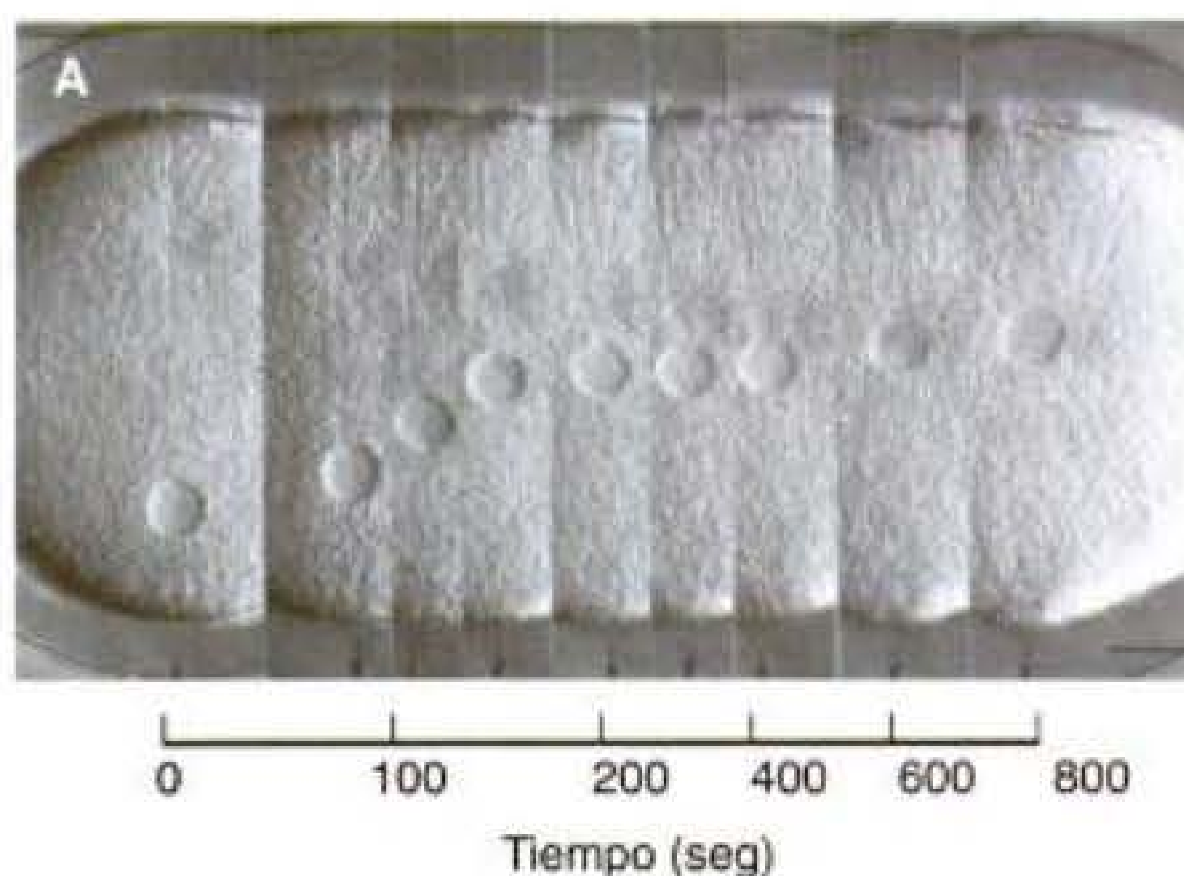
Fig. 7-30. La explosión de síntesis de proteínas en la fecundación utiliza a los mRNA almacenados en el citoplasma del ovocito. A. Síntesis de proteínas en un embrión de erizo de mar *Arbacia punctulata* fecundado ante la presencia o ausencia de actinomicina D, un inhibidor de la transcripción. Durante las pocas primeras horas, la síntesis de proteínas se produce sin que se lleve a cabo transcripción en los núcleos del cigoto o del embrión. Una segunda explosión de síntesis de proteínas se produce durante el estadio de blástula media. Esta explosión representa la traducción de mensajeros que han sido transcriptos nuevamente, y por esta razón no es vista en embriones que crecen con actinomicina. B. Incremento en el porcentaje de ribosomas reclutados en los polisomas durante las primeras horas del desarrollo del erizo de mar, especialmente durante el primer ciclo celular. (A, según Gross y col. 1964; B, según Humphreys 1971.)

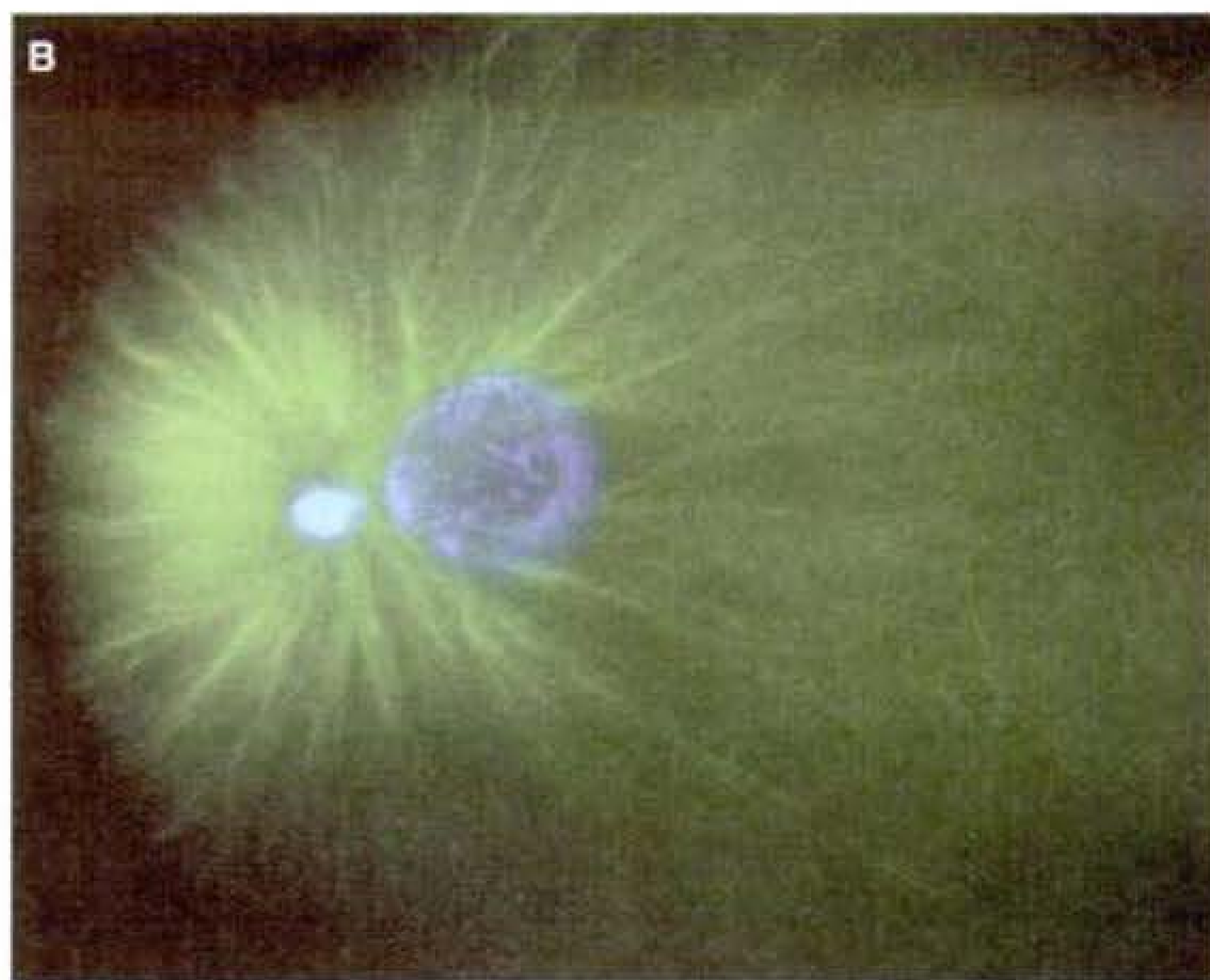
de la fusión de las membranas del espermatozoide y del óvulo, el núcleo del espermatozoide y su centríolo se separan de las mitocondrias y del flagelo. Las mitocondrias y el flagelo se desintegran dentro del óvulo, tan solo muy pocas, si alguna, mitocondrias de espermatozoide son encontradas en los organismos en desarrollo o adultos. Por lo tanto, aunque cada gameto contribuye al cigoto con un genoma haploide, el genoma mitocondrial es transmitido primariamente a partir de la herencia materna. Al contrario, en casi todos los animales estudiados (el ratón es la excepción principal), el centrosoma necesario para producir el huso mitótico de las divisiones subsiguientes es derivado del centríolo del espermatozoide (véase fig. 7-21; Sluder y col. 1989, 1993).

En erizos de mar, la fecundación se produce después de la segunda división meiótica, de modo tal que hay un **pronúcleo haploide** en el citoplasma del óvulo cuando se produce el ingreso del espermatozoide. Una vez dentro del óvulo, el núcleo del espermatozoide experimenta una dramática transformación cuando éste se descondensa para formar el **pronúcleo masculino**. En primer lugar, la envoltura nuclear se vesiculiza en pequeños paquetes, exponiendo la cromatina compacta del espermatozoide al citoplasma del óvulo (Longo y Kunkle 1978; Poccia y Collas 1997). A continuación las proteínas que tienen a la cromatina del espermatozoide en este estadio condensado inactivo son intercambiadas por otras proteínas derivadas del citoplasma del óvulo (que en este momento es un cigoto). Este intercambio permite la descondensación de la cromatina del espermatozoide. En los erizos de mar, la descondensación parece ser iniciada por la fosforilación de la proteína de la lámina de la envoltura nuclear y la fosforilación de dos histonas específicas de espermatozoides que se unen fuertemente al DNA. Este proceso comienza cuando el espermatozoide entra en contacto con una glucoproteína en la capa gelatinosa del óvulo que eleva el nivel de actividad de la proteína cinasa dependiente de cAMP. Esta proteína cinasa fosforila a varios residuos básicos de histonas específicas de espermatozoides y por lo tanto interfiere con su unión al DNA (Garbers y col. 1980, 1983; Porter y Vacquier 1986; Stephens y col. 2002). Se piensa que este relajamiento facilita el reemplazo de las histonas específicas de espermatozoides por otras histonas que han sido almacenadas en el citoplasma del ovocito (Poccia y col. 1981; Green y Poccia 1985). Una vez descondensado, el DNA puede comenzar la transcripción y replicación.

Después de la entrada del espermatozoide del erizo del mar al óvulo, el pronúcleo masculino rota 180° de modo tal que el centríolo del espermatozoide está entre el pronúcleo del espermatozoide y el pronúcleo del óvulo. A continuación, el centríolo del espermatozoide actúa como un centro organizador de microtúbulos, extendiendo sus propios microtúbulos para formar un áster.* Estos microtúbulos se extienden a través del óvulo y contactan al pronú-

* Cuando Oscar Hertwig observó esta formación radial de los ásteres de los espermatozoides formándose en los óvulos de erizos de mar recién fecundados (cigotos), los denominó "el sol en el cigoto," y los pensó como el indicador feliz de una fecundación exitosa (Hertwig 1877). Más recientemente, Simerly y col. (1999) hallaron que ciertos tipos de esterilidades masculinas humanas eran debidas a defectos en la capacidad de los centríolos para formar estos ásteres microtubulares. Esta deficiencia provoca la falla de la migración pronuclear y la detención del desarrollo adicional.





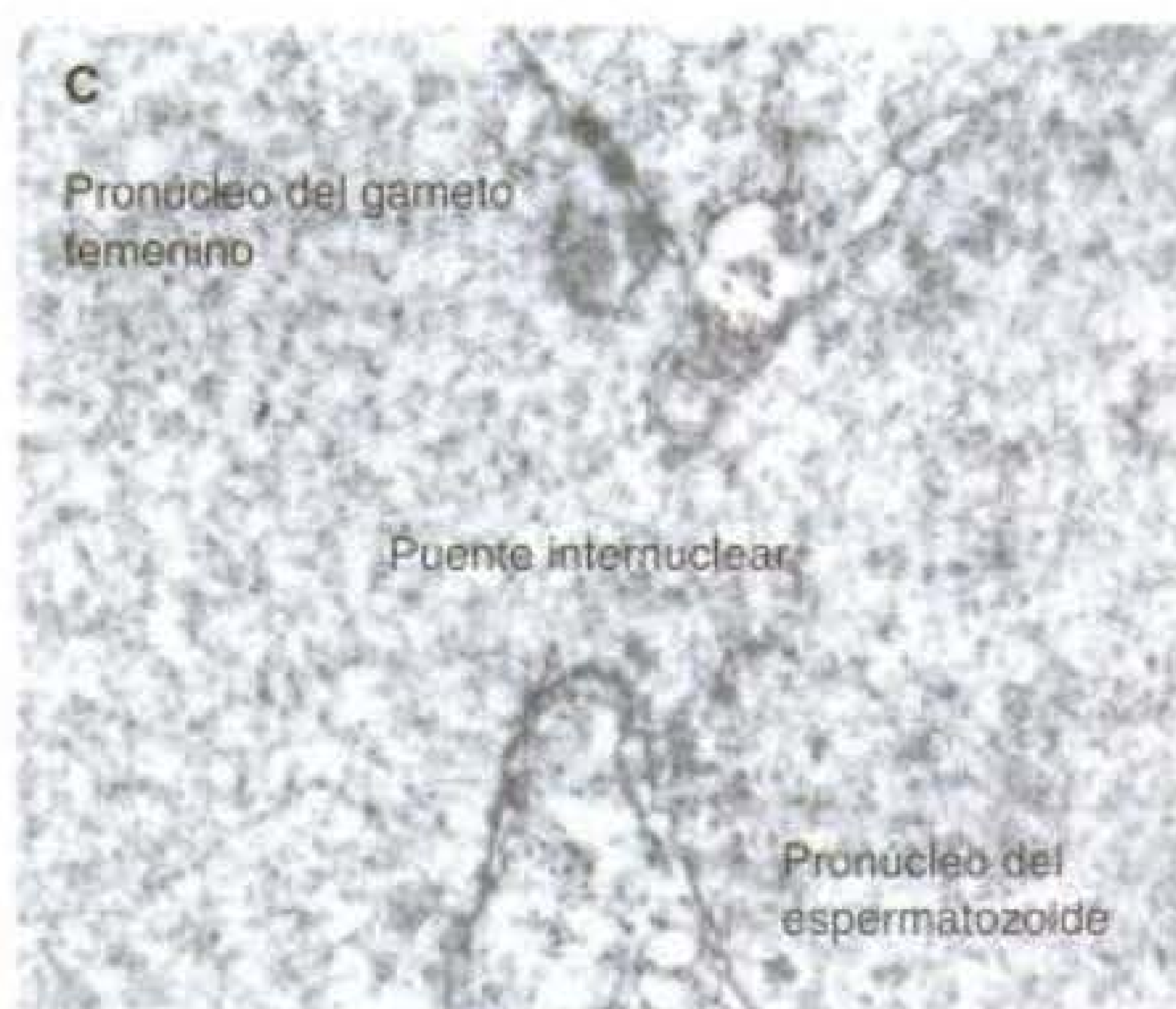


Fig. 7-31. Eventos nucleares en la fecundación del erizo de mar. **A.** Fotografías secuenciales que muestran la migración del pronúcleo del óvulo y del pronúcleo del espermatozoide acercándose entre sí en un cigoto de *Clypeaster japonicus*. El pronúcleo del espermatozoide está rodeado por su áster de microtúbulos. **B.** Los dos pronúcleos migran sobre estos procesos microtubulares acercándose entre sí. (El DNA pronuclear está teñido de azul por la tinción de Hoechst.) Los microtúbulos (teñidos de verde con anticuerpos fluorescentes para tubulina) irradian desde el centrosoma asociados con el (más pequeño) pronúcleo másculino y alcanzan al pronúcleo femenino. **C.** Fusión de los pronúcleos en el cigoto del erizo de mar. (**A**, de Hamaguchi e Hiramoto 1980, cortesía de los autores; **B**, de Holy y Schatten 1991, cortesía de J. Holy; **C**, cortesía de F. J. Longo.)

cleo femenino, y los dos pronúcleos migran acercándose entre sí (Hamaguchi e Hiramoto 1980; Bestor y Schatten 1981). Su fusión forma el **núcleo diploide del cigoto** (fig. 7-31). La síntesis de DNA puede comenzar en el estadio pronuclear (durante la migración) o después de la formación del núcleo del cigoto, y depende de la liberación temprana de calcio en la fecundación (Jaffe y col. 2001).

Fusión del material genético en mamíferos

En mamíferos, el proceso de migración pronuclear toma cerca de 12 horas, comparado con menos de una hora en los erizos de mar. El espermatozoide de mamíferos entra casi tangencialmente a la superficie del gameto femenino (ovocito II) en lugar de aproximarse perpendicularmente, y se fusiona con numerosas microvellosidades (véase fig. 7-20). El DNA del núcleo del espermatozoide está unido a proteínas básicas denominadas protaminas, que están altamente compactadas mediante uniones disulfuro. El glutatión en el citoplasma del cigoto (ovocito II fecundado) reduce estas uniones disulfuro y permite que la cromatina del espermatozoide se desenrolle (Calvin y Bedford 1971; Kvist y col. 1980; Perreault y col. 1988).

El espermatozoide de mamíferos entra al ovocito que tiene su núcleo "detenido" en la metafase de la segunda división meiótica (fig. 7-32A; véase fig. 7-5). Las oscilaciones del calcio inactivan a la MAP cinasa y permiten la síntesis de DNA. Pero a diferencia del óvulo de erizo de mar, que está ya en un estado haploide, el ovocito de mamíferos todavía tiene cromosomas en la mitad de la metafase meiótica. Las oscilaciones del calcio activan a otra cinasa que lleva a la proteólisis de ciclina (permitiendo de este modo que continúe el ciclo celular) y securina (la proteína que mantiene juntos a los cromosomas en metafase) (Watanabe y col. 1991; Johnson y col. 1998).

La síntesis de DNA se produce separadamente en cada pronúcleo, y el centrosoma (nuevo centríolo) que acompaña al pronúcleo masculino produce sus ásteres (en gran medida a partir de proteínas almancenadas en el ovocito). Estos microtúbulos unen a los dos pronúcleos y les permiten migrar para acercarse entre sí. Sobre el encuentro, las dos envolturas nucleares desaparecen (fig. 7-23B). Sin embargo, en lugar de producir un núcleo común del cigoto (como sucede en la fecundación del erizo de mar), la cromatina se condensa en cromosomas que se orientan sobre un huso mitótico común (fig. 7-32C). Por

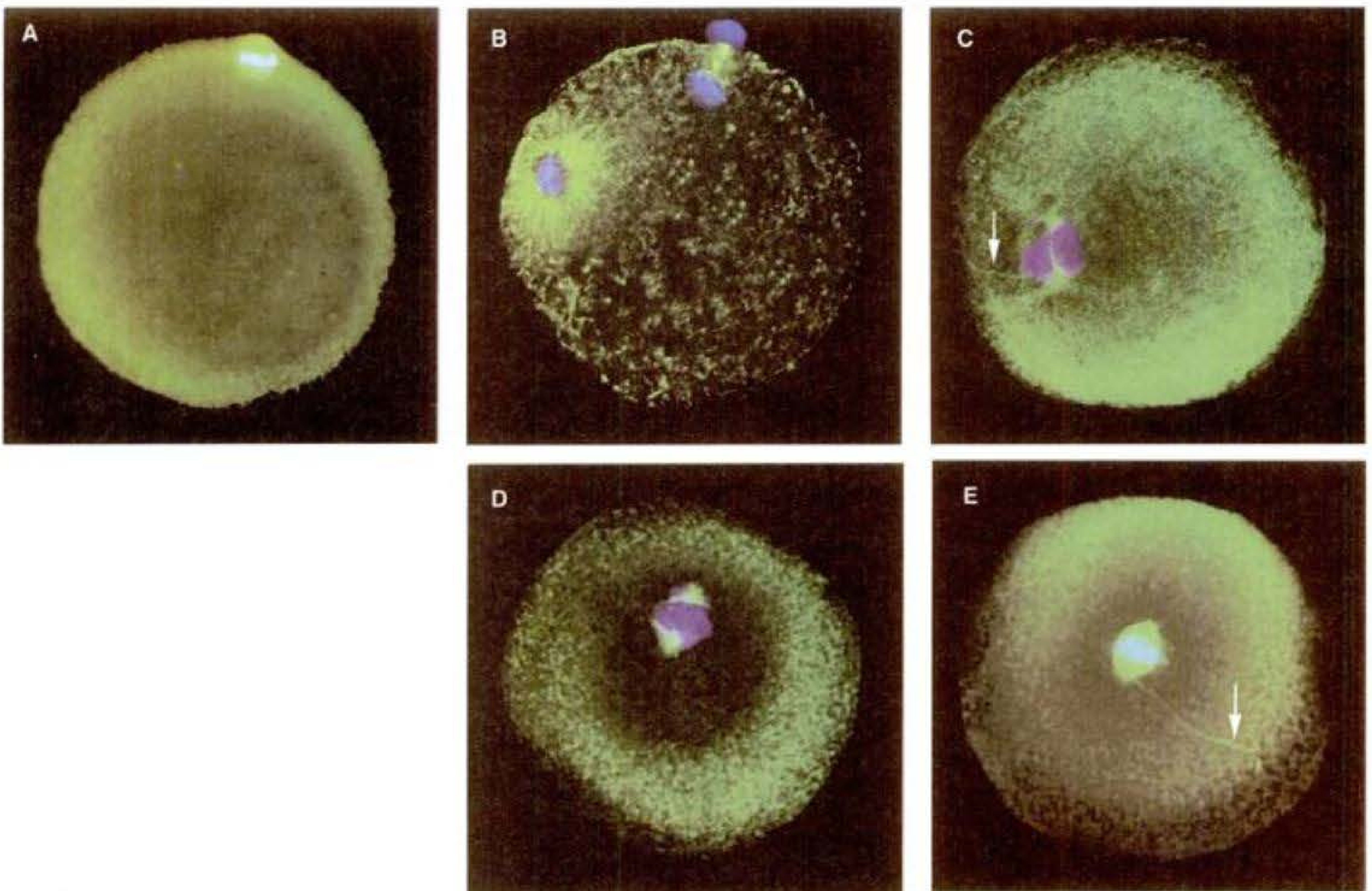


Fig. 7-32. Movimientos pronucleares durante la fecundación humana. Los microtúbulos han sido teñidos de verde, mientras que el DNA está teñido de azul. La flecha señala la cola del espermatozoide. **A.** El ovocito maduro sin fecundar completa la primera división meiótica, brotando un cuerpo polar. **B.** Cuando el espermatozoide ingresa al ovocito (lado izquierdo), los microtúbulos se condensan alrededor de éste hasta que el ovocito completa la segunda división meiótica en la periferia. **C.** Cerca de 15 horas después de la fecundación, los dos pronúcleos se han acercado, y el centrosoma se separa para organizar una formación microtubular bipolar. La cola del espermatozoide todavía puede verse (*flecha*). **D.** En la primera profase mitótica, los cromosomas derivados del espermatozoide y los derivados del ovocito se condensan separadamente cuando se forman los polos del huso mitótico. **E.** En la prometafase, los cromosomas del espermatozoide y del ovocito se mezclan en el ecuador de la metafase y el huso mitótico comienza la primera división mitótica. Todavía puede ser vista la cola del espermatozoide. (De Simerly y col. 1995; fotografías cortesía de G. Schatten.)

lo tanto, en mamíferos el verdadero núcleo haploide no se ve en el cigoto, sino en el estadio de dos células.

Las mitocondrias del espermatozoide y su DNA son degradados en el citoplasma del cigoto, de modo tal que todos los cuerpos mitocondriales son derivados a partir de la madre. El cigoto y el embrión parecen deshacerse de las mitocondrias paternas mediante la dilución y la selección activa de las mitocondrias de los espermatozoides para su destrucción (Cummins y col. 1998; Shitara y col. 1998; Schwartz y Vissing 2002).

> SITIO WEB 7.7 **Descondensación del espermatozoide (Sperm decondensation).** La formación del pronúcleo masculino involucra cambios en la cromatina y en la envoltura nuclear. La pieza anular nuclear puede ser crítica para desenrollar el DNA.

Reorganización del citoplasma del cigoto

La fecundación puede iniciar desplazamientos radicales de los materiales citoplasmáticos del cigoto (gameto femenino recién fecundado). Mientras que estos movimientos citoplasmáticos no son obvios en los cigotos de mamíferos o del erizo de mar, hay varias especies en las que estas reorganizaciones del citoplasma del ovocito son cruciales para la diferenciación celular tardía en el desarrollo. En los cigotos de tunicados, como se verá en el capítulo 8, las reorganizaciones citoplasmáticas son particularmente obvias debido a la pigmentación diferente de las distintas regiones del gameto femenino. Tales movimientos citoplasmáticos son además fácilmente visibles en los cigotos de anfibios. En ranas, un único espermatozoide puede entrar en cualquier sitio sobre el hemisferio animal del gameto femenino; cuando esto sucede, cambia el patrón citoplasmático del huevo (en estadio de cigoto). Originalmente, el huevo (en estadio de gameto femenino) es radialmente simétrico sobre el eje animal vegetal. Sin embargo, luego de la entrada del espermatozoide, el citoplasma cortical (externo) se mueve cerca de 30º hacia el punto de entrada del espermatozoide, en relación al citoplasma interno (Manes y Elinson 1980; Vincent y col. 1986). En algunas ranas (tal como en la *Rana*), una región del gameto femenino que inicialmente estaba cubierta por el citoplasma cortical oscuro del hemisferio animal es expuesta por este movimiento (fig. 7-33). Este citoplasma subyacente, localizado cerca del ecuador sobre el lado opuesto al punto de entrada del espermatozoide, contiene gránulos de pigmento difuso y por esta razón aparece gris. Por lo tanto, esta región ha sido referida como la **medialuna gris** (Roux 1987; Ancel y Vintenberger 1948). Como se verá en los siguientes capítulos, la medialuna gris marca la región donde es iniciada la gastrulación en embriones de anfibio. En ranas como *Xenopus*, en las que no aparece medialuna gris, las marcaciones con tinciones confirman que el citoplasma cortical rota 30º en relación al citoplasma subcortical interno (Vincent y col. 1986).

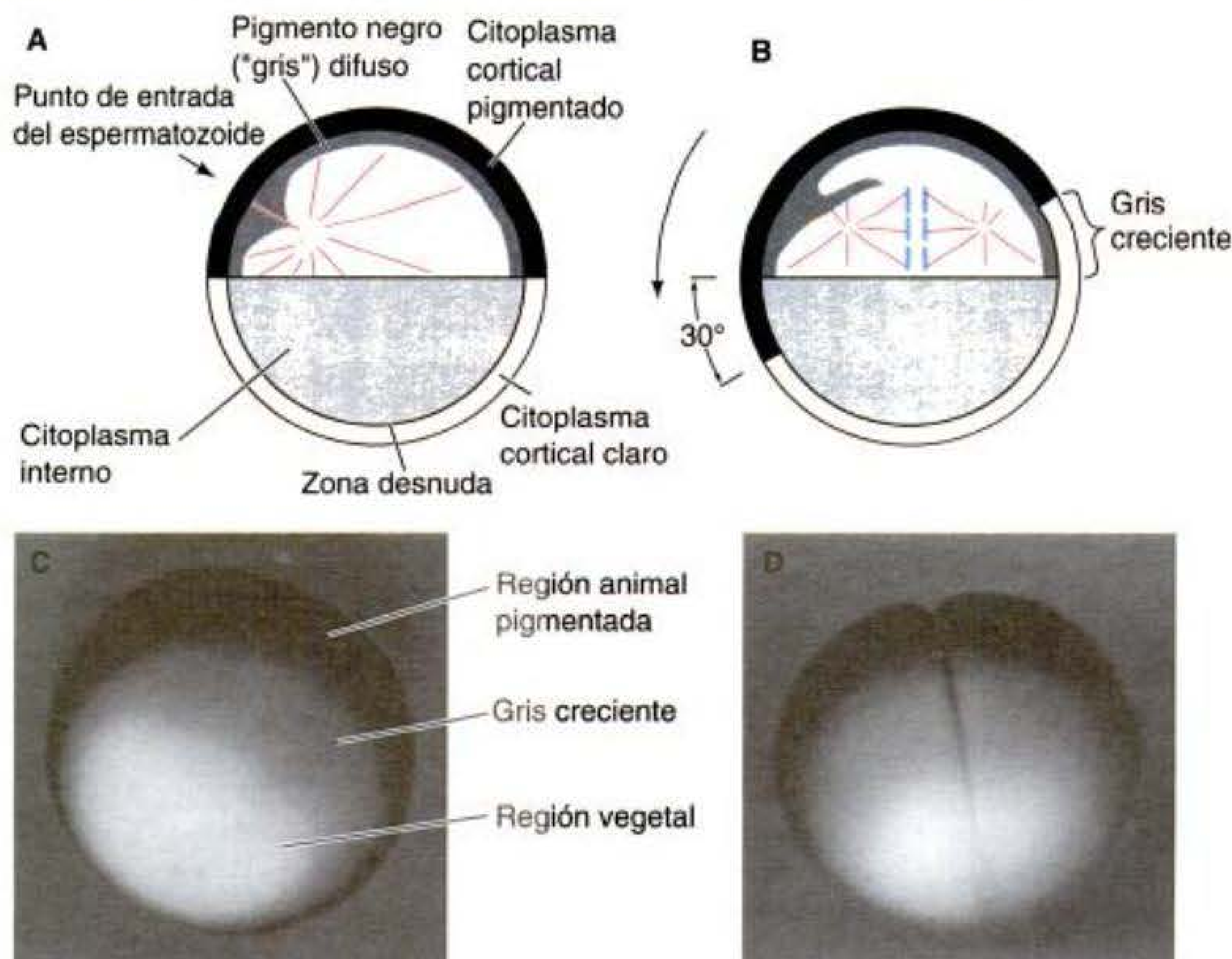


Fig. 7-33. Reorganización del citoplasma en los huevos (estadio de cigoto) de rana recién fecundados. **A.** Sección transversal esquemática de un cigoto a mitad de camino de su primer ciclo de segmentación. El cigoto tiene simetría radial a lo largo de su eje animal vegetal. El espermatozoide ha ingresado en uno de los lados, y el núcleo del espermatozoide está migrando hacia dentro. La corteza representada es como la de *Rana*, con un hemisferio animal altamente pigmentado y un hemisferio vegetal no pigmentado. **B.** Cerca del 80% de las veces durante la primera segmentación, el citoplasma cortical rota 30° en relación con su citoplasma interno. La gastrulación comenzará en la medialuna gris, la región opuesta al punto de entrada del espermatozoide donde se produce el mayor desplazamiento de citoplasma. **C.** La medialuna gris de *R. pipiens* inmediatamente después de la rotación cortical presenta una pigmentación diferente por debajo del citoplasma cortical altamente pigmentado. **D.** El primer surco de segmentación biseca la medialuna gris. (**A**, **B**, según Gerhart y col. 1989; **C**, **D**, fotografías cortesía de R. P. Elinson.)

Información adicional y especulaciones

La no equivalencia de los pronúcleos de los mamíferos

En general se asume que los machos y las hembras llevan genomas haploides equivalentes. En efecto, uno de los principios fundamentales de la genética mendeliana es que los genes derivados del espermatozoide son funcionalmente equivalentes de aquellos derivados del gameto femenino. Sin embargo, como se vio en el capítulo 5, la impronta genómica puede ocurrir en mamíferos de modo tal que el genoma derivado del espermatozoide y el genoma derivado del gameto femenino pueden ser funcionalmente diferentes y desempeñar funciones complementarias durante ciertos estados del desarrollo.

La primera evidencia para la no equivalencia provino de estudios de un tumor humano denominado **mola hidatidiforme,** que se asemeja a tejido placentario. Se ha demostrado que la mayoría de estas molas se originan a partir de la fecundación por un espermatozoide haploide de un ovocito II en el que el pronúcleo femenino está ausente. Después de ingresar al ovocito II, el espermatozoide duplica sus cromosomas, restaurando de esta forma el número cromosómico diploide. Por lo tanto, la totalidad del genoma es derivada del espermatozoide (Jacobs y col. 1980; Ohama y col. 1981). Aquí se ve una situación en la que las células sobreviven, se dividen, y tienen un número cromosómico normal, pero el desarrollo es anormal. En lugar de formarse un embrión, el cigoto llega a ser una masa de células parecidas a la placenta. Cuando la totalidad del genoma viene del padre masculino no se produce desarrollo normal.

A la inversa, cuando el genoma deriva en su totalidad del ovocito II no se produce desarrollo normal. La capacidad para desarrollar un embrión sin la contribución espermática es denominada **partenogénesis** (griego, "nacimiento virgen"). Los gametos femeninos de muchos invertebrados y de algunos vertebrados son capaces de desarrollarse normalmente ante la ausencia de espermatozoides (véanse caps. 2 y 19). Sin embargo, los mamíferos no presentan partenogénesis. Colocando ovocitos de ratón en un medio de cultivo que activa artificialmente al ovocito mientras que suprime la formación de un segundo cuerpo polar producen cigotos de ratón diploides cuya herencia es derivada únicamente del ovocito (Kaufman y col. 1977). Estas células se dividen para formar embriones con médulas espinales, músculos, huesos y órganos, incluidos corazones que laten. Sin embargo, el desarrollo no continúa, y hacia el día 10 u 11 (a mitad de camino de la gestación del ratón), estos embriones partenogenéticos se deterioran. Ni el desarrollo humano ni el de ratón pueden ser completados únicamente con derivados cromosómicos a partir del ovocito.

La hipótesis que los pronúcleos masculino y femenino son necesarios para el desarrollo normal obtiene apoyo a partir de los experimentos de trasplantes pronuclear (Surani y Barton 1983; Surani y col. 1986; McGrath y Solter 1984). El pronúcleo masculino o el femenino pueden ser quitados de los ovocitos de ratón recién fecundados (cigotos) y agregados a otros recién fecundados. (Los dos pronúcleos pueden ser distinguidos en este estadio debido a que el pronúcleo femenino es el que se encuentra por debajo del cuerpo polar.) Por lo tanto, pueden ser construidos cigotos con dos pronúcleos femeninos o masculinos. Aunque se produce la segmentación embrionaria, ninguno de estos dos tipos de cigotos se desarrolla hasta el nacimiento, mientras que algunos cigotos controles (conteniendo un pronúcleo masculino y uno femenino de diferentes cigotos) experimentando tales trasplantes se desarrollan normalmente (cuadro 7-2). Por lo tanto, los pronúcleos derivados del espermatozoide y del ovocito II son críticos para que se produzca el desarrollo de mamíferos.

Cuadro 7-2 *Experimentos de trasplante pronuclear*

Clases de cigotos reconstruidos	*Operación*	*Número de trasplantes satisfactorios*	*Número de progenies sobrevivientes*
Bimaternal	♀♂ ♀♂	339	0
Bipaternal	♀♂ ♀♂	328	0
Control	♀♂ ♀♂	348	18

Fuente: McGrath y Solter 1984.

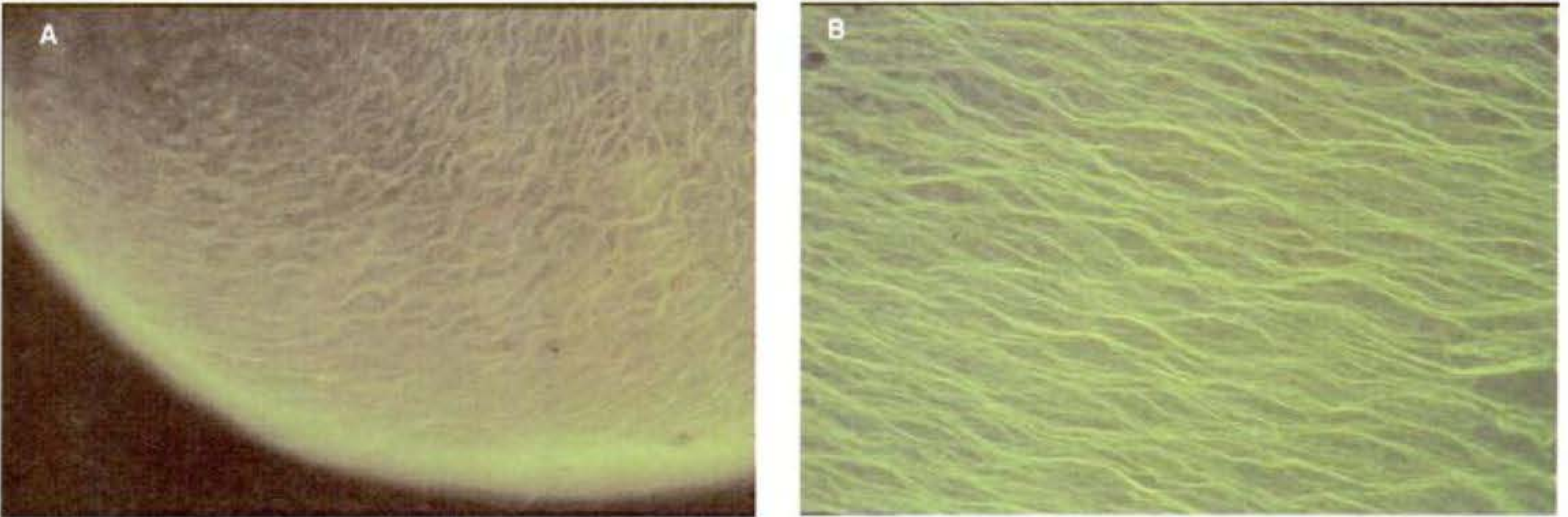


Fig. 7-34. Formaciones paralelas de microtúbulos extendidas a lo largo del hemisferio vegetal junto al futuro eje dorso-ventral. Estas formaciones se ven aquí en la segunda mitad del primer ciclo celular utilizando anticuerpos fluorescentes para tubulina. **A.** Vista que mira al hemisferio vegetal. **B.** Mayor aumento de las formaciones de microtúbulos paralelos. Previamente a la rotación citoplasmática (a mitad de camino del primer ciclo celular), no se observan formaciones de microtúbulos, y al final de la rotación citoplasmática, los microtúbulos se despolimerizan. (Fotografías cortesía de R. P. Elinson.)

El motor para el movimiento citoplasmático en los cigotos de anfibios parece ser una formación de microtúbulos paralelos que se forman entre el citoplasma cortical y el citoplasma interno del hemisferio vegetal paralelo a la dirección de rotación citoplasmática. Estos senderos microtubulares se observan por primera vez inmediatamente antes del comienzo de la rotación, y desaparecen cuando cesa la rotación (fig. 7-34; Elinson y Rowning 1988). Tratando al cigoto con colchicina o radiación ultravioleta al comienzo de la rotación, se detiene la formación de estos microtúbulos, por lo cual se inhibe la rotación citoplasmática. Utilizando anticuerpos que se unen a microtúbulos, Houliston y Elinson (1991a) encontraron que estas pistas estaban formadas por microtúbulos derivados del espermatozoide y del gameto femenino, y que el centríolo del espermatozoide dirige la polimerización de los microtúbulos de modo tal que ellos crecen hacia la región vegetal del cigoto. Al alcanzar la corteza vegetal, los microtúbulos se dirigen alejándose del punto de entrada del espermatozoide, hacia el polo vegetal. La posición de centro del centríolo del espermatozoide cuando este inicia la polimerización de microtúbulos proporciona la direccionalidad de la rotación. Los microtúbulos parecen estar adheridos al citoplasma cortical mediante una ATPasa relacionada a quinesina (Marrari y col. 2000). Como se verá en el capítulo 10, estos movimientos citoplasmáticos inician una cascada de eventos que determinan el eje dorso-ventral de la rana.

Hacia el final del primer ciclo celular, entonces, el citoplasma ha sido reorganizado, los pronúcleos se han encontrado, el DNA se está replicando, y están siendo traducidas nuevas proteínas. La etapa se prepara para el desarrollo de un organismo multicelular.

VADE MECUM². **Fecundación de anfibios (Amphibian fertilization).** El movimiento de citoplasma en respuesta a la fecundación en los cigotos de anfibios es frecuentemente ilustrado en modelos. Aquí se pueden ver modelos 3-D de este evento compilado en una película.
[Hacer clic sobre Amphibian]

Resumen: fecundación

1. La fecundación lleva a cabo dos actividades separadas: sexualidad (la combinación de los genes derivados de ambos padres) y reproducción (la creación de un nuevo organismo).
2. Los eventos de la fecundación generalmente incluyen 1) el contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino, 2) la regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino, 3) la fusión del material genético de los dos gametos y 4) la activación del metabolismo del cigoto para dar comienzo al desarrollo.
3. La cabeza del espermatozoide consiste de un núcleo haploide y de un acrosoma. El acrosoma es derivado del aparato de Golgi y contiene las enzimas necesarias para digerir las cubiertas extracelulares que rodean al gameto femenino. La pieza media y el cuello del espermatozoide contienen a las mitocondrias y al centríolo que genera los microtúbulos del flagelo. La energía para el movimiento flagelar proviene del ATP mitocondrial y de una dineína ATPasa en el flagelo.
4. El gameto femenino puede ser un óvulo (con un núcleo haploide, como en erizos de mar) o un ovocito (en un estado temprano del desarrollo, como en mamíferos). El óvulo o el ovocito tiene una gran masa citoplasmática almacenando ribosomas, mRNA, y

proteínas nutritivas. Otros mRNA y proteínas, utilizados como factores morfogenéticos, también son almacenados en el gameto femenino. Los gránulos corticales yacen debajo de la membrana celular del gameto femenino. Muchos gametos femeninos también contienen agentes protectores necesarios para la supervivencia en sus ambientes particulares.

5. Rodeando a la membrana celular del gameto femenino se encuentra una capa extracelular utilizada frecuentemente en el reconocimiento del espermatozoide. En la mayoría de los animales, esta capa extracelular es la membrana vitelina. En mamíferos ésta es la zona pelúcida que es mucho más gruesa.

6. En muchas especies, el gameto femenino secreta moléculas difusibles que atraen y activan al espermatozoide.

7. En erizos de mar, la reacción acrosómica es iniciada por compuestos que están presentes en la capa gelatinosa. La vesícula acrosómica experimenta exocitosis para liberar estas enzimas. La actina globular se polimeriza para extender el proceso acrosómico. La bindina sobre el proceso acrosómico es reconocida por un complejo proteico presente sobre la superficie del óvulo del erizo de mar.

8. En mamíferos, los espermatozoides deben ser capacitados en el tracto reproductivo femenino antes de poder ser competentes para fecundar al gameto femenino (ovocito II en la mayoría de los casos).

9. Los espermatozoides de mamíferos se unen a la zona pelúcida antes de experimentar la reacción acrosómica. En el ratón, esta unión está mediada por ZP3 (proteína de zona 3) y varias proteínas del espermatozoide que la reconocen. La reacción acrosómica de mamíferos es iniciada sobre la zona pelúcida y las enzimas acrosómicas es concentrada sobre ésta.

10. La fusión entre el espermatozoide y el gameto femenino está mediada probablemente por moléculas proteicas cuyos grupos hidrofóbicos pueden fusionar las membranas celulares del espermatozoide y del gameto femenino. En los erizos de mar, la bindina puede mediar la fusión de gametos. En mamíferos, el mecanismo de fusión continúa siendo polémico.

11. Se produce polispermia cuando dos o más espermatozoides fecundan a un gameto femenino. Ésta es generalmente letal, debido a que sus blastómeras tienen números y tipos diferentes de cromosomas.

12. Muchas especies tienen dos bloqueos de la polispermia. El bloqueo rápido es eléctrico y está mediado por los iones sodio: la membrana del gameto femenino eleva el potencial de reposo, y los espermatozoides no pueden fusionarse con el gameto femenino. El bloqueo lento es físico y está mediado por los iones calcio. Se propaga una onda de Ca^{2+} desde el punto de entrada del espermatozoide, llevando a que los gránulos corticales se fusionen con la membrana celular del gameto femenino. Los contenidos liberados de los gránulos hacen que la membrana vitelina se eleve y endurezca convirtiéndose en la membrana de fecundación.

13. En mamíferos, el bloqueo de la polispermia incluye la modificación de las proteínas de zona por los contenidos de los gránulos corticales de modo tal que los espermatozoides no pueden unirse más a la zona pelúcida.

14. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) es responsable de la liberación de Ca^{2+} a partir del almacenamiento en el retículo endoplasmático. Se piensa que el DAG (diacilglicerol) inicia la elevación del pH en el cigoto (gameto femenino recién fecundado). El Ca^{2+} libre, apoyado por la alcalinización del cigoto, activa el metabolismo, la síntesis de proteínas y la síntesis de DNA del cigoto.

15. IP_3 es producido por fosfolipasas. Distintas especies pueden utilizar diferentes mecanismos para activar a las fosfolipasas.

16. El aumento del Ca^{2+} libre intracelular al momento de la fecundación en anfibios y en mamíferos provoca la degradación de la ciclina y la inactivación de la MAP cinasa, permitiendo que sea completada la metafase de la segunda meiosis y que se forme el pronúcleo femenino haploide.

17. Los pronúcleos masculino y femenino migran acercándose entre sí. En algunas especies, como en mamíferos, el DNA se replica cuando ellos se mueven. En otras especies (como en erizos de mar), la replicación del DNA se produce después de la fusión de los pronúcleos.

18. En erizos de mar, los pronúcleos se fusionan y se forma un núcleo cigoto diploide. En mamíferos, la membrana pronuclear se desintegra cuando se produce la aproximación de los pronúcleos, y sus cromosomas se reúnen alrededor de una placa metafásica común.

19. Los cambios microtubulares provocan movimientos citoplasmáticos. Estas reorganizaciones del citoplasma pueden ser críticas en la especificación de qué porciones del cigoto van a desarrollarse en cuál órgano.

20. El centríolo, heredado frecuentemente a partir del espermatozoide, organiza los microtúbulos en el cigoto y puede causar los movimientos del citoplasma durante el primer ciclo celular.

Bibliografía citada

Afzelius, B. A. 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. Science 193: 317-319.

Alves, A.-P., B. Mulloy, J. A., Diniz and P. A. S. Mourao. 1997. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosome reactions in sperms of sea urchins. J. Biol. Chem. 272: 6965-6971.

Ancel, P. and P. Vintenberger. 1948. Recherches sur le determinisme de la symmetrie bilatérale dans l'oeuf des amphibiens. Bull. Biol. Fr. Belg. [Suppl.] 31: 1-182.

Arnoult, C., I. G. Kazam, P. E. Visconti, G. Kopf, M. Villaz and H. Florman. 1999. Control of the low-voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. Proc. Natl. Acad Sci USA 96: 6757-6762.

Austin, C. R. 1952. The "capacitation" of mammalian sperm. Nature 170: 327.

Austin, C. R. 1960. Capacitation and the release of hyaluronidase. J. Reprod Fertil. 1: 310-311.

Austin, C. R. 1965. Fertilization. Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ.

Benoff, S. 1993. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa, Hum. Reprod 8: 2001-2008.

Bentley, J. K., H. Shimomura and D. L. Garbers. 1986. Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. Cell 45: 281-288.

Ben-Yosef, D., Y. Oron and R. Shalgi. 1996. Intracellular pH in rat eggs is not affected by fertilization and the resulting calcium oscillations. Biol. Reprod. 55: 461-468.

Berridge, M. 1 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. Nature 361: 315-325.

Bestor, T. M. and G. Schatten. 1981. Anti-tubulin immunofluorescence microscopy of microtubules present during the pronuclear movements of sea urchin fertilization. Dev. Biol. 88: 80-91.

Bi, G.-Q., J. M. Alderton and R. A. Steinhardt. 1995. Calcium-mediated exocytosis is required for cell membrane resealing. J. Cell. Biol. 131: 1747-1758.

Bleil, J. D. and P. M. Wassarman. 1980. Mammalian sperm and egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse-egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell. 20: 873-882.

Bleil, J. D. and P. M. Wassarman. 1986. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. J. Cell. Biol. 102: 1363-1371.

Bleil, J. D. and P. M. Wassarman.1988. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is' essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. Proc. Natl. Acad Sci USA 85: 6778-6782.

Bleil, J. D., J. M. Greve and P. M. Wassarman. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. Dev. Biol. 28: 376-385.

Bogart, J. P., R. P. Elinson and L. E. Licht. 1989. Temperature and sperm incorporation in poly-ploid salamanders. Science 246: 1032-1034.

Boveri, T. 1902. On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus. [Translated by S. Gluecksohn-Waelsch.] In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, 1974.

Boveri, T. 1907. Zellenstudien VI. Die Entwick-lung dispermer Seeigeleier. Ein Beitrage zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kernes. Jena Z. Naturwiss. 43: 1-292.

Busa, W. B., J. E. Ferguson, S. K. Joseph, J. R. Williamson and R. Nuccitelli. 1985. Activation of frog (Xenopus laevis) eggs by inositol triphosphate. I. Characterization of Ca^{2+} release from mtracellular stores. J. Cell Biol. 100: 677-682.

Calvin, H. I. and J. M. Bedford. 1971. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. [Suppl.] 13: 675.

Carroll, D. J. and D. Epel. 1975. Isolation and biological activity of the proteases released by sea urchin eggs following fertilization. Dev. Biol. 44: 22-32.

Carroll, D. J., C. S. Ramarao, L. Mehlmann, S. Roche, M. Terasaki and L. A. Jaffe. 1997. Calcium release at at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase Cγ. J. Cell Biol. 138: 1303-1311.

Carroll, D. J., D. T. Albay, M. Terasaki, L. A. Iaffe and K. R. Foltz.1999. Identification of PLCy-dependent and independent events during fertilization of sea urchin eggs. Dev. Biol. 206: 232-247.

Carroll, D. J., D. T. Albay, K. M. Hoag, F. J. O'Neill, M. Kumano and K. R. Foltz. 2000. The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. Dev. Biol. 217: 179-191.

Castellano, L. E., G. Martínez-Cadena, J. López-Godínez, A. Obregon and J. García-Soto. 1997. Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in the sea urchin sperm. Eur. J. Cell Biol. 74: 329-335.

Chambers, E. L., B. C. Pressman and B. Rose. 1974. The activity of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X-537A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60: 126-132.

Chandler, D. E. and J. Heuser. 1979. Membrane fusion during secretion: Cortical granule exocytosis in sea urchin eggs as studied by quick-freezing and freeze fracture. J. Cell Biol. 83: 91-108.

Chang, M. C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature 168: 697-698.

Cherr, G. N., H. Lambert, S. Meizel and D. F. Katz. 1986. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on zona pellucida and induction by homologous zonaepeilucidae. Dev. Biol. 114: 119-131.

Clermont, Y. and C. P. Leblond. 1955. Spermiogenesis of man, monkey, and other animals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. Am. J. Anat. 96: 229-253.

Cohen-Dayag, A., J. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach and M. Eisenbach. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11039-11043.

Colwin, A. L. and L. H. Colwin.1963. Role of the gamete membranes in fertilization in Saccoglossus kowalevskii (Enteropneustra). I. The acrosome reaction and its changes in early stages of fertilization. J. Cell Biol. 19: 477-500.

Conner, S. and G. M. Wessel. 1998. rab3 mediates cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. Dev. Biol. 203: 334-344.

Conner, S., D. Leaf and G. M. Wessel. 1997. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. Mol. Reprod. Dev. 48: 106-118.

Cormier, P., S. Pyronnet, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, N. Sonenberg and R. Bellé. 2001. eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. Dev. Biol. 232: 275-283.

Cook, S. P. and D. F. Babcock. 1993. Selective modulation by cGMP of the K^+ channel activated by speract. J. Biol. Chem. 268: 22402-22407.

Correia, L. M. and E. J. Carroll, Jr. 1997. Characterization of the vitelline envelope of the sea urchin Strongylocentratus purpuratus. Dev. Growth Diff. 39: 69-85.

Corselli, J. and P. Talbot. 1987. In vivo penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. Dev. Biol. 122: 227-242.

Cross, N. L. 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod. 59: 7-11.

Cross, N. L. and R. P. Elinson. 1980. A fast block to polyspermy in frogs media-

ted by changes in the membrane potential. Dev. Biol. 75: 187-198.

Cummins, J. M., T. Wakayama and R. Yanagimachi. 1998. Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. Zygote 5: 301-308.

Dan, J. C. 1967. acrosome reaction and lysins. In C. B. Metz, Jr., and A. Monroy (eds.), Fertilization, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 237-367.

Davis, B. K. 1978. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. In J. J. Kabara (ed.), Symposium of the Pharmacological Effect of Lipids. #Amer. Oil Chem Soc., Champaign, IL, pp. 145-157.

De Robertis, E. D. P., F. A. Saez and E. M. F. De Robertis. 1975. Cell Biology, 6th Ed. Saunders Philadelphia.

Ducibella, T. and 8 others. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. Dev. Biol. 250: 280-291.

Eisen, A. and G. T. Reynolds. 1985. Sources and sinks for the calcium release during fertilization of single sea urchin eggs. J. Cell Biol. 100: 1522-1527.

Eisenbach, M. 1995. Sperm changes enabling fertilization in mammals. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes 2: 468-475.

Eisenbach, M. and I. Tur-Kaspa. 1999. Do human eggs attract spermatozoa? Bioessays 21: 203-210.

Elinson, R. P. and B. Rowning. 1988. A transient array of parallel microtubules in frog eggs: Potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. Dev. Biol. 128: 185-197.

Endo, Y. G., G. S. Kopf and R. M. Schultz. 1987. Effects of phorbol ester on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction-inducing activity of the mouse zona pellucida protein, ZP3. Dev. Biol. 123: 574-577.

Epel, D. 1977. The program of fertilization. Sci Am. 237(5): 128-138.

Epel, D. 1980. Fertilization. Endeavour N.S. 4: 26-31.

Epel, D., C. Patton, R. W. Wallace and W. Y. Cheung. 1981. Calmodulin activates NAD ki nase of sea urchin eggs: An early response. Cell 23: 543-549.

Evans, J. P. 2001. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: Insights into cell adhesion and fertilization. BioEssays 23: 628-639.

Ferris, C. D., R. L. Huganir, S. Supattapone and S. H. Snyder. 1989. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. Nature 342: 87-89.

Florman, H. M. and B. T. Storey. 1982. Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev. Biol. 91: 121-130.

Florman, H. M. and P. M. Wassarman. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell 41:313-324.

Florman, H. M., M. E. Corron, T. D.-H. Kim and D. F. Babcock. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. Dev. Biol. 152: 304-314.

Florman, H. M., C. Arnoult, I. Kazam, C. Li and C. M. B. O'Toole. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: A tale of two channels. Biol. Reprod. 59: 12-17.

Foerder, C. A. and B. M. Shapiro. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens fertilization membrane with tyrosine crosslinks. Proc Natl. Acad. Sci USA 74: 4214-4218.

Fol, H. 1877. Sur le commencement de l'hé-mogénie chez divers animaux. Arch. Zool. Exp. Gén. 6: 145-169.

Foltz, K. R., J. S. Partin and W. J. Lennarz. 1993. Sea urchin egg receptor for sperm: Sequence similarity of binding domain and hsp 70. Science 259: 1421-1425.

Franklin, L. E. 1970. Fertilization and the role of the acrosome reaction in non-mammals. Biol. Reprod. [Suppl.] 2: 159-177.

Furuichi, T., S. Yoshikawa, A. Miyawaki, It. Wada, N. Maeda and K. Mikoshiba. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. Nature 342: 32-38.

Galantino-Homer, H. L., P. E. Visconti and G. S. Kopf. 1997. Regulation of protein tyrosine kinase phosphorylation during bovine capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. Biol. Reprod. 56: 707-719.

Garbers, D. L., D. J. Tubb and G. S. Kopf 1980. Regulation of sea urchin sperm cAMP-dependent protein kinases by an egg associated factor. Biol. Reprod. 22: 52532.

Garbers, D. L., G. S. Kopf, D. J. Tubb and G. Olson.1983. Elevation of sperm adenosine 3':5'-monophosphate concentrations by a fucose sulfate-rich complex associated with eggs. I, Structural characterization. Biol. Reprod. 29: 1211-1220.

Gardiner, D. M. and R. D. Grey. 1983. Membrane junctions in Xenopus eggs: Their distribution suggests a role in calcium regulation. J. Cell. Biol. 96: 1159-1163.

Gerhart, J., M. Danilchik, T. Doniach, S. Roberts, B. Rowning and R. Stewart. 1989. Cortical rotation of the Xenopus egg: Consequences for the anterioposterior pattern of embryonic dorsal development. Development 1989 [Suppl.]: 37-51.

Gilbert, S. F. 1994. Developmental Biology, 4th Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Gilkey, J. C., L. F. Iaffe, E. G. Ridgway and G. T Reynolds. 1978. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, Oryzias latipes. J. Cell. Biol. 76: 448-467.

Giusti, A. F., K. M. Hoang and K. R. Foltz. 1997. Surface localization of the sea urchin egg receptor for sperm. Dev. Biol. 184: 10-24.

Giusti, A. F., D. J. Carroll, Y. A. Abassi and K. R. Foltz. 1999a. Evidence that a starfish egg Src family tyrosine kinase associates with PLC-γl SH2 domains at fertilization. Dev. Biol. 208: 189-199.

Giusti, A. F., D. I. Carroll, Y. A. Abassi, M. Terasaki, K. R. Foltz and L. A. Iaffe. 1999b. Requirement of a Src family kinase for initiating calcium release at fertilization in starfish eggs. I. Biol. Chem. 274: 29318-29322.

Glabe, C. G. and W. J. Lennarz. 1979. Species-specific sperm adhesion in sea urchins: A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. J. Cell Biol. 83: 595-604.

Glabe, C. G. and V. D. Vacquier. 1977. Species-specific agglutination of eggs by bindin isolated from sea urchiri sperm. Nature 267: 836-838.

Glabe, C. G. and V. D. Vacquier. 1978. Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 881-885.

González-Martínez, M. T., A. Guerrero, E. Morales, L. de la Torre and A. Darszon. 1992. A depolarization can trigger Ca^{2+} uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in

L. pictus sea urchin sperm. Dev. Biol. 150: 193-202.

Gould, M. and J. L. Stephano. 1987. Electrical response of eggs to acrosomal protein similar to those induced by sperm. Science 235: 1654-1657.

Gould, M. and J. L. Stephano. 1991. Peptides from sperm acrosomal protein that activate development. Dev. Biol. 146: 509-518.

Gould-Somero, M., L. A. Jaffe and L. Z. Holland. 1979. Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, Urechis caupo. J. Cell. Biol. 82: 426 440.

Green, G. R and E. L. Poccia. 1985. Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation. Dev. Biol. 108: 235-245.

Gross, P. R., L. I. Malkin and W. Moyer. 1964. Templates for the first proteins of embryonic development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51: 407-414.

Gwatkin, R. B. L. 1976. Fertilization. In G. Poste and G. L. Nicolson (eds.), The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development. Elsevier North-Holland, New York, pp. 1-53.

Hafner, M., C. Petzelt, R. Nobiling, J. B. Pawley, D. Kramp and G. Schatten. 1988. Wave of free calcium at fertilization in the sea urchin egg visualized with Fura-2. Cell Motil. Cytoskel. 9: 271-277.

Haley, S. A. and G. M. Wessel. 1999. The cortical granule serine protease CGSP I of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus, is autocatalytic and contains a low-density lipoprotein receptor-like domain. Dev. Biol. 211: 1-10.

Hamaguchi, M. S. and Y. Hiramoto. 1980. Fertilization process in the heart-urchin, Clypaester japonicus, observed with a differential interference microscope. Dev. Growth Diff. 22: 517-530.

Hardy, D. M., T. Harumi and D. L. Garbers. 1994. Sea urchin sperm receptors for egg peptides. Semin. Dev. Biol. 5: 217-224.

Harrison, R. G. 1937. Embryology and its relations. Science 85: 369-374.

Hartsoeker, N. 1694. Essai de dioptrique. Paris.

Heinecke, J. W. and B. M. Shapiro. 1989. Respiratory oxygen burst of fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1259-1263.

Hertwig, O. 1877. Beitrage zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung, und Theilung des theirischen Eies. Morphol. Jahr. 1: 347-452.

Hirohashi, N. and W. J. Lennarz. 2001. Role of a vitelline layer-associated 350 kDa glycoprotein in controlling species-specific gamete interaction in the sea urchin. Deu Growth Di: 43: 247-255.

Hirohashi, N. and V. D. Vacquier. 2002a. High molecular weight fucose sulfate polymer is required for opening both Ca^{2+} channels involved in triggering the sea urchin acrosome reaction. J. Biol. Chem. 277: 1182-1189.

Hirohashi, N. and V. D. Vacquier. 2002b. Egg fucose sulfate polymer, sialoglycan, and speract all trigger the sea urchin sperm acrosome reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296: 833-839.

Hirohashi, N., A. C. Vilela-Silva, P. A. Mourao and V. D. Vacquier. 2002. Structural requirements for species-specific induction of the sperm acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 298: 403-407.

Holy, J. and G. Schatten. 1991. Spindle pole centrosomes of sea urchin embryos are partially composed of material recruited from maternal stores. Dev. Biol. 147: 343-353.

Houliston, E. and R. P. Elinson. 1991a. Evidence for the involvement of microtubules, endoplasmic reticulum, and kinesin in cortical rotation of fertilized frog eggs. J. Cell Biol. 114: 1017-1028.

Humphreys, T. 1971. Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization in sea urchins. Dev. Biol. 26: 201-208.

Hunter, R. H. F. 1989. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. Zool. J. Linn. Soc. 95: 117-124.

Hylander, B. L. and R. G. Summers. 1982. An ultrastructural and immunocytochemical localization of hyaline in the sea urchin egg. Dev. Biol. 93: 368-380.

Iwao, Y. and L. A. Jaffe. 1989. Evidence that the voltage-dependent component in the fertilization process is contributed by the sperm. Dev. Biol. 134: 446-451.

Jacobs, P. A., C. M. Wilson, J. A. Sprenkle, N. B. Rosenshein and B. R. Migeon. 1980. Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. Nature 286: 714-717.

Jaffe, L. A. 1976. Fast block to polyspermy in sea urchins is electrically mediated. Nature 261: 68-71.

Jaffe, L. A. 1980. Electrical polyspermy block in sea urchins: Nicotine and low sodium experiments. Dev. Growth Diff. 22: 503-507.

Jaffe, L. A. and N. L. Cross. 1983. Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. Biol. Reprod. 30: 554.

Jaffe, L. A., A. F. Giusti, D. J. Carroll and K. R. Foltz. 2001. Ca^{2+} signaling during fertilization of echinoderm eggs. Semin. Cell Dev. Biol. 12: 45-51.

Iaffe, L. F. 1983. Sources of calcium in egg activation: A review and hypothesis. Dev. Biol. 99: 265-277.

Johnson, J., B. M. Bierle, G. I. Gallicano and D. G. Capco. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin. Regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. Dev. Biol. 204: 464-477.

Just, E. E. 1919. The fertilization reaction in Echinarachidus parma. Biol. Bull. 36: 1-10.

Kaji, K., S. Oda, S. Miyazaki and A. Kudo. 2002. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81: Polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. Dev. Biol. 247: 327-334.

Kaufman, M. H., S. C. Barton and M. A. H. Surani. 1977. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. Nature 265: 53-55.

Kimura, Y., R. Yanagimachi, S. Kuretake, H. Bortiewicz, A. C. F. Perry and H. Yanagimachi. 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear ma terial. Biol. Reprod. 58: 1407-1415.

Kinsey, W. H. and S. S. Shen. 2000. Role of the Fyn kinase in calcium release during fertilization of the sea urchin egg. Dev. Biol. 225: 253-264.

Kopf, G. S. 1998. acrosome reaction. In E. Knobil and J. D. Neill (eds.), Encydopedia of Reproduction, vol. 1. Academic Press, San Diego, pp. 17-27.

Kuretake, S., Y. Kimura, K. Hoshi and R. Yanagimachi. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. Biol. Reprod. 55: 789-795.

Kvist, U., B. A. Afzelius and L. Nilsson.1980. The intrinsic mechanism of chromatin decondensation and its activation in human spermatozoa. Dev. Growth Diff. 22: 543-554.

LaFleur, G. J., Jr., Y. Horiuchi and G. M. Wessel. 1998. Sea urchin ovoperoxidase: Oocyte-specific member of a heme-dependent peroxidase superfamily that functions in the block to polyspermy. Mech. Dev. 70: 77-89.

Lee, S.-J. and S. S. Shen. 1998. The calcium transient in sea urchin eggs during fertilization requires the production of inositol 1,4,5-trisphosphate. Dev. Biol. 193: 195-208.

Leeuwenhoek, A. van. 1685. Letter to the Royal Society of London. Quoted in E. G. Ruestow, 1983, Images and ideas: Leeuwenhoek's perception of the spermatozoa. J. Hist. Biol. 16: 185-224.

Lefebvre, R., P. J. Chenoweth, M. Drost, C. T. LeClear, M. MacCubbin, J. T. Dutton and S. S. Suarez, 1995. Characterization of the oviductal sperm receptor in cattle. Biol. Reprod. 53: 1066-1074.

Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant and C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science 287: 319-321.

Levine, A. E., K. A. Walsh and E. J. B. Fodor. 1978. Evidence of an acrosin-like enzyme in sea urchin sperm. Dv. Biol. 63: 299-307.

Leyton, L. and P. Saling. 1989. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J. Cell. Biol. 108: 2163-2168.

Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P. M. Saling. 1992. Regulation of mouse gametic interaction by a sperm tyrosine kinase. Proc. Natl. Acad Sci. USA 93: 1164-1169.

Lin, Y., K. Mahan, W. F. Lathrop, D. G. Myles and P. Primakoff 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. J. Cell Biol. 125: 1157-1163.

Longo, F. J. and M. Kunkle. 1978. Transformation of sperm nuclei upon insemination. In A. A. Moscona and A. Monroy (eds.), Current Topics in Developmental Biology, vol. 12. Academic Press, New York, pp. 149-184.

Longo, F. J., J. W. Lynn, D. H. McCulloh and E. L. Chambers. 1986. Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm-egg interactions of the sea urchin Lytechinus variegatus. Dev. Biol. 118: 155-167.

López, L. C., E. M. Bayna, D. Litoff, N. L. Shaper, J. H. Shaper and B. D. Shur. 1985. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. J. Cell Biol. 101: 1501-1510.

Luttmer, S. and F. J. Longo.1985. Ultrastructural and morphometric observations of cortical endoplasmic reticulum in Arbacia, Spisula, and mouse eggs. Dev. Growth Diff: 27: 349-359.

Manes, M. E. and R. P. Elinson. 1980. Ultraviolet light inhibits gray crescent formation in the frog egg. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 189: 73-77.

Marrari, Y., M. Terasaki, V. Arrowsmith and E. Houliston. 2000. Local inhibition of cortical rotation in Xenopus eggs by an anti-KRP antibody. Dev. Biol. 224: 250-262.

McCulloh, D. H. and E. L. Chambers. 1992. Fusion of membranes during fertilization. J. Gen. Physiol. 99:137-175.

McGrath, J. and D. Solter. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genome. Cell 37: 179-183.

McPherson, S. M., P. S. McPherson, L. Mathews, K. P. Campbell and F. J. Longo.1992. Cortical localization of a calcium release channel in sea urchineggs. J. Cell. Biol. 116: 1111-1121.

Mead, K. S. and D. Epel. 1995. Beakers and breakers: How fertilisation in the laboratory differs from fertisation in nature. Zygote 3: 95-99.

Meizel, S. 1984. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammal ian sperm acrosome reaction. Biol. Rev. 125-1 7.

Metz, C. B. 1978. Sperm and egg receptors volved in fertilization. Curr. Top. Dev. Biol. 107-148.

Metz, E. C. and S. R. Palumbi 1996. Positive selection and sequence rearrangements generate extensive polymorphism in the gamete recognition protein bindin. Mol. Biol. Evol.13: 397-406.

Miller, B. S. and D. Epel. 1999. The roles of changes in NADPH and pH during fertilization and artificial activation of the sea urchin egg. Dev. Biol. 216: 394-405.

Miller, D. J., M. B. Macek and B. D. Shur. 1992. Complementarity between sperm surface β-1 ,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature 357: 589-593.

Miller, D. J., X. Gong, G. Decker and B. D. Shur. 1993. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. J. Cell. Biol. 123: 1431-1440.

Miller, R. L. 1978. Site-specific agglutination and the timed release of a sperm chemoattractant by the egg of the leptomedusan, Orthopyxis caliculata. J. Exp. Zool. 205: 385-392.

Miller, R. L. 1985. Sperm chemo-orientation in the metazoa. In C. B. Metz, Jr., and A. Monroy (eds.), Biology of Fertilization, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 275-337.

Miyado, K. and 11 others. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science 287: 321-319.

Miyazaki, S.-I., M. Yuzaki, K. Nakada, H. Shirakawa, S. Nakanishi, S. Nakade and K. Mikoshiba. 1992. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. Science 257: 251-255.

Mohri, T., P. I. Ivonnet and E. L. Chambers. 1995. Effect of sperm-induced activation current and increase of cytosolic Ca^{2+} by agents that modify the mobilization of $[Ca^{2+}]$. I. Heparin and pentosan polysulfate. Dev. Biol. 172: 139-157.

Moller, C. C. and P. M. Wassarman. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. Dev. Biol. 132: 103-112.

Moy, G. W. and V. D. Vacquier. 1979. Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. Curr. Top. Dev. Biol. 13: 31-44.

Mozingo, N. M. and D. E. Chandler. 1991. Evidence for the existence of two assembly domains within the sea urchin fertilization envelope. Dev. Biol. 146: 148-157.

Multigner, L., I. Gagnon, A. van Dorsselaer and D. Job. 1992. Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. Nature 360: 33-39.

Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233: 305-312.

Ogawa, K., T. Mohri and H. Mohri. 1977. Identification of dynein as the outer arms of sea urchin sperm axonemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5006-5010.

Ohama, K. and 7 others. 1981. Dispermic origin of XY hydatidiform moles. Nature 292: 551-552.

Perreault, S. D., R. R. Barbee and V. L. Slott. 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev. Biol. 125: 181-187.

Perry, A. C. F., T. Wakayama, I. M. Cook and R. Yaganimachi. 2000. Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: Induction of calcium transients and involvement of proteolysis. Dev. Biol. 217: 386-393.

Pinto-Correia, C. 1997. The Ovary of Eve: Eggs and Sperm and Preformation. University of Chicago Press, Chicago.

Poccia, D. and P. Collas. 1997. Nuclear envelope dynamics during male pronuclear development. Dev. Growth Diff. 39: 541-550.

Poccia, D., J. Salik and G. Krystal. 1981. Transitions in histone variants of the male pronucleus following fertiliation and evidence for a maternal store of cleavage-stage histones in the sea urchin egg. Dev. Biol. 82: 287-297.

Porter, D. C. and V. D. Vacquier. 1986. Phosphorylation of sperm histone H1 is induced by the egg jelly layer in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Dev. Biol. 116: 203-212.

Prevost, J. L. and J. B. Dumas. 1824. Deuxieme mémoire sur la génération. Ann. Sci. Nat. 2: 129-149.

Primakoff, P. and D. G. Myles. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. Science 296: 2183-2185.

Primakoff, P., W. Lathrop, L. Woolman, A. Cowan and D. Myles. 1988. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. Nature 335: 543-547.

Ralt, D. and 8 others. 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. Proc Natl. Acad. Sci. USA 88: 2840-2844.

Ramarao, C. S. and D. L. Garbers. 1985. Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. J. Biol. Chem. 260: 8390-8397.

Rees, B. B., C. Patton, J. L Grainger and D. Epel. 1995. Protein synthesis increases after fertilization of sea urchin eggs in the absence of an increase in intracellular pH. Dev. Biol. 169: 683-698.

Ren, D. and 7 others. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 413: 603-609.

Roux, W. 1887. Beitrage zur Entwicklungs-mechanik des Embryo. Arch. Mikrosk, Anat. 29: 157-212.

Runft, L. L., L. A. Jaffe and L. M. Mehlmann. 2002. Egg activation at fertilization: Where it all begins. Dev. Biol. 245: 237-254.

Saling, P. M., J. Sowinski and B. T. Storey. 1979. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucida in vitro: Sequential relationship to acrosome reaction. J. Exp. Zool. 209: 229-238.

Saunders, C. M. and 7 others. 2002. PLCζ: A sperm-specific trigger of Ca^{++} oscillations in eggs and embryo development. Development 129: 3533-3544.

Schackmann, R. W. and B. M. Shapiro. 1981. A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of Strongylocentrotus purpuratus. Dev. Biol. 81: 145-154.

Schatten, G. and D. Mazia. 1976. The penetration of the spermatozoan through the sea urchin egg surface at fertilization: Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. Exp. Cell Res. 98: 325-337.

Schatten, H. and G. Schatten. 1980. Surface activity at the plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin-B sensitivity: Scanning electron micrography and time-lapse video microscopy during fertilization of the sea urchin Lytechinus variegatus. Dev. Biol. 78: 435-449.

Schroeder, T. E.1979. Surface area change at fertilization: Resorption of the mosaic membrane. Dev. Biol. 70: 306-327.

Schwartz, M. and J. Vissing. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. New Engl. J. Med. 347: 576-580.

Shearer, J., C. D. Nadal, F. Emily-Fenouil, C. Gache, M. Whitaker and B. Ciapa. 1999. Role of phospholipase Cγ at fertilization and during meiosis in sea urchin eggs and embryos. Development 126: 2273-2284.

Shen, S. S. and R. A. Steinhardt. 1978. Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. Nature 272: 253-254.

Shi, X., S. Amindari, K. Paruchuru, D. Skalla, H. Burkin, B. D. Shur and D. J. Miller. 2001. Cell surface β-1,4-galactosyltransferase-1 activates G protein-dependent exocytotic signaling. Development 128: 645-654.

Shimomura, H., L. J. Dangott and D. L. Garbers. 1986. Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. J. Biol. Chem. 261: 15778-15782.

Shinyoji, C., H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama and T. Yanagida. 1998. Dynein arms are oscillating force generators. Nature 393: 711-714.

Shitara, H., H. Kaneda, A. Sato and H. Honekawa. 1998. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. Genetics 156: 1277-1284.

Simerly, C. and 7 others. 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. Nature Med. 1: 47-52.

Simerly, C. and 7 others. 1999. Biparental inheritance of γ-tubulin during human fertilization: Molecular reconstitution of functional zygote centrosomes in inseminated human oocytes and in cell-free extracts nucleated by human sperm. Mol. Cell Biol. 10: 2955-2969.

Sluder, G., F. J. Miller, K. K. Lewis, E. D. Davison and C. L. Reider. 1989. Centrosome inheritance in starfish zygotes: Selective loss of the maternal centrosome after fertilization. Dev. Biol. 131: 567-579.

Sluder, G., F. J. Miller and K. Lewis. 1993. Centrosome inheritance in starfish zygotes. II. Selective suppression of the maternal centrosome during meiosis. Dev. Biol. 155: 58-67.

Smith, T. T. 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. Biol. Reprod. 58: 1102-1104.

Stears, R. L. and W. J. Lennarz. 1997. Mapping sperm binding domains on the sea urchin egg receptor for sperm. Dev. Biol. 187: 200-208.

Steinhardt, R. A. and D. Epel.1974. Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1915-1919.

Steinhardt, R., R. Zucker and G. Schatten. 1977. Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol. 58: 185-197.

Stephens, S. and 7 others. 2002. Two kinase activities are sufficient for sea urchin sperm chromatin decondensation in vitro. Mol. Reprod. Dev. 62: 496-503.

Storey, B. T. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: The sperm's eye view. Reprod. Fertil. Dev. 7: 927-942.

Suárez, S. S.1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: Mechanisms of formation. Biol. Reprod 58: 1105-1107.

Suarez, S. S., D. F. Katz, D. H. Owen, J. B. Andrew and R. L. Powell.1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. Biol. Reprod. 44: 375-381.

Summers, R. G. and B. L. Hylander. 1974. An ultrastructural analysis of early fertilization in the sand dollar, Echinarachnius parma. Cell Tissue Res. 150: 343-368.

Summers, R. G. and B. L. Hylander. 1975. Species-specificity of acrosome reaction and primary gamete binding in echinoids. E. Cell Res. 96: 63-68.

Summers, R. G., B. L. Hylander, L. H. Colwin and A. L. Colwin. 1975. The functional anatomy of the echinoderm spermatozoon and its interaction with the egg at fertilization. Am. Zool. 15: 523-551.

Surani, M. A. H. and S. C. Barton. 1983. Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. Science 222: 1034-1037.

Surani, M. A. H., S. C. Barton and M. L. Norris. 1986. Nuclear transplantation in the mouse: Heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. Cell 45: 127-137.

Sutovsky, P., C. S. Navara and G. Schatten. 1996. Fate of the sperm mitochondria and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. Biol. Reprod. 55: 1195-1205.

Swann, K. and M. Whitaker. 1986. The part played by inositol trisphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. J. Cell Biol. 103: 2333-2342.

Tachibana, I. and M. E. Hemler. 1999. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. J. Cell. Biol. 146: 893-904.

Terasaki, M. 1996. Actin filament translocations in sea urchin eggs. Cell Motil. Cytoskel. 34: 48-56.

Terasaki, M. and C. Sardet. 1991. Demonstration of calcium uptake and release by sea urchin egg cortical endoplasmic reticulum. J. Cell Biol.115: 1031-1037.

Tilney, L. G., J. Bryan, D. J. Bush, K. Fujiwara, M. S. Mooseker, D. B. Murphy and D. H. Snyder. 1973. Microtubules: Evidence for 13 protofilaments. J. Cell Biol. 59: 267-275.

Tilney, L. G., D. P. Kiehart, C. Sardet and M. Tilney.1978. Polymerization of actin. IV. Role of Ca^{2+} and H^{+} in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosome reaction of echinoderm sperm. J. Cell Biol. 77: 536-560.

Tombes, R. M. and B. M. Shapiro. 1985. Metabolite channeling: A phosphocreatine shuttle to mediate high-energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. Cell 41: 325-334.

Tomes, C. N., M. Michaut, G. D. Blas, P. Visconti, U. Matti and L. S. Mayoga. 2002. SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. Dev. Biol. 243: 326-338.

Topfer-Petersen, E., A. Wagner, J. Friedrich, A. Petrunkina, M. Ekhlasi-Hundrieser, D. Waberski and W. Drommer. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. J. Exp. Zool. 292: 210-215.

Turner, P. R., L. A. laffe and A. Fein. 1986. Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP-binding protein. J. Cell Biol. 102: 70-77.

Ulrich, A. S., M. Otter, C. G. Glabe and D. Hoekstra. 1998. Membrane fusion is induced by a distinct peptide sequence of the sea urchin fertilization protein bindin. J. Biol. Chem. 273: 16748-16755.

Ulrich, A. S., W. Tichelaar, G. Forster, O. Zschornig, S. Weinkauf and H. W. Meyer. 1999. Ultrastrunural characterization of peptide-induced membrane fusion and peptide self-as-sembly in the lipid bilayer. Biophys. J. 77: 829-841.

Uzzell, T. M. 1964. Relations of the diploid and triploid species of the Ambystoma jeffersonianum complex. Copeia 1964: 257-300.

Vacquier, V. D. 1979. The interaction of sea urchin gametes during fertilization. Am. Zool. 19: 839-849.

Vacquier, V. D.1998. Evolution of gamete recognition proteins. gcience 281: 1995-1998.

Vacquier,V. D. and G.W. Moy.1977. Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2456-2460.

Vacquier, V. D. and J. E. Payne. 1973. Methods for quantitating sea urchin sperm in egg binding. Exp. Cell. Res. 82: 227-235.

Vacquier, V. D., M. J. Tegner and D. Epel. 1973. Protease release from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy. Exp. Cell Res. 80:111-119.

Van Steirtinghem, A. 1994. IVF and micromanipulation techniques for male-factor fertility. Curr. Opin. Obstet. Gynaecol. 6: 173-177.

Vilela-Silva, A. C., M. O. Castro, A. P. Valente, C. H. Biermann and P. A. Mourao. 2002. Sulfated fucans from the egg jelly of sea urchins: Sulfated fucans from the egg jelly of the closely related sea urchins Strongylocentrotus droebachiensis and S. pallidus ensure species-specific fertilization. J. Biol. Chem. 277: 379-387.

Vincent, J. P., G. F. Oster and J. C. Gerhart.1986. Kinematics of gray crescent formation in Xenopus eggs: The displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Dev. Biol. 113: 484-500.

Visconti, P. E. and G. S. Kopf 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Biol. Reprod. 59: 1-6.

Visconti, P. E. and 7 others. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. Development 121: 1139-1150.

von Kolliker, A. 1841. Beiträge zur Kenntnis der Geschlectverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Thiere, nebst einem Versuch Über Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samenthiere. Berlin.

Wang, Y., R. Storeng, P. O. Dale, T. Abyholm and T. Tanbo. 2001. Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermato-

zoa in vitro. Gynecol. Endocrinol. Ward, C. R. and G. S. Kopf. 1993. events mediating sperm activation. 158: 9-34.

Ward, G. E., C. J. Brokaw, D. L. Garbers and V. D. Vacquier. 1985. Chemotaxis of Arbacia punctulata spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. J. Cell Biol. 101: 2324-2329.

Wassarman, P. M. 1989. Fertilization in mammals. Sci. Am. 256(6): 78-84.

Wassarman, P. M., L. Jovine and E. S. Litscher. 2001. A profile of fertilization in mammals. Nature Cell Biol. 3: E59-E64.

Watanabe, N., T. Hunt, Y. Ikawa and N. Sagata. 1991. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of Xenopus eggs. Nature 352: 247-249.

Whitaker, M. and R. F. Irvine. 1984. Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. Nature 312: 636-639.

Whitaker, M. and R. Steinhardt. 1982. Ionic regulation of egg activation. Q. Rev. Biophys. 15: 593-667.

Wilcox, A. J., C. R. Weinberg and D. D. Baird. 1995. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation: Effects on the probability of conception, survival of pregnancy, and the sex of the baby. N. Engl. J. Med. 333: 1517-121.

Wilson, W. L. and G. Oliphant. 1987. Isolation and biochemical characterization of the subunits of the rabbit sperm acrosome stabilizing factor. Biol. Reprod. 37: 159-169.

Winkler, M. M., R. A. Steinhardt, J. L. Grainger and L. Minning. 1980. Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. Nature 287: 558-560.

Xu, Z., G. S. Kopf and R. M. Schultz. 1994. Involvement of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} release in early and late events of mouse egg activation. Development 120: 1851-1859.

Yamagata, K., A. Honda, S. I. Kashiwabara and T. Baba. 1999. Difference of acrosomal serine protease system between mouse and other rodent sperm. Dev. Genet. 25: 115-122.

Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In E. Knobil and J. D. Neill (eds.), The Physiology of Reproduction, 2nd Ed. Raven Press, New York.

Yanagimachi, R. and Y. D. Noda. 1970. Electron Molecular microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. Am. J. Anat. 128: 429-462.

Yoshida, M., K. Inabar and M. Morisawa. 1993. Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians Ciona savignyi and Ciona intestinalis. Dev. Biol. 157: 497-507.

Capítulo 8 Desarrollo temprano en invertebrados seleccionados

Por lo tanto, estudiando el período de segmentación, nos acercamos a la fuente de donde emergen las corrientes progresivamente ramificadas de la diferenciación que terminan finalmente en piscinas casi silenciosas, las células individuales del organismo complejo adulto.

E. E. JUST (1939)

No es el nacimiento, el matrimonio o la muerte, sino la gastrulación, lo que llega a ser verdaderamente el período más importante de tu vida.

LEWIS WOLPERT (1986)

SORPRENDENTE COMO ES, la fecundación es sólo el paso que inicia el desarrollo. El cigoto, con su nuevo potencial genético y su nueva organización del citoplasma, ahora comienza a producir un organismo multicelular. Entre los acontecimientos de la fecundación y los de la formación de un órgano se encuentran dos estadios críticos: segmentación y gastrulación. Durante la segmentación, divisiones celulares rápidas dividen al citoplasma del gameto femenino fecundado (cigoto) en numerosas células. A continuación estas células experimentan desplazamientos espectaculares durante la gastrulación, proceso por el cual se mueven a diferentes partes del embrión y adquieren nuevos vecinos (véase cap. 2). Durante la segmentación y la gastrulación, se determinan los principales ejes del embrión y las células comienzan a adquirir sus respectivos destinos.

Mientras que la segmentación siempre precede a la gastrulación, la formación de ejes puede comenzar tan temprano como durante la formación del ovocito. Ésta puede completarse durante la segmentación (como en *Drosophila*) o extenderse completamente a través de la gastrulación (como sucede en *Xenopus*). Hay tres ejes que necesitan ser especificados: el eje anteroposterior (cabeza-ano), el eje dorsoventral (espalda-vientre) y el eje izquierda-derecha. Las distintas especies determinan estos ejes a diferentes tiempos, utilizando distintos mecanismos.

UNA INTRODUCCIÓN A LOS PROCESOS DE DESARROLLO TEMPRANO

Segmentación

Después de la fecundación, el desarrollo de un organismo multicelular continúa mediante un proceso denominado **segmentación,*** una serie de divisiones mitóticas por medio de las cuales el enorme volumen del citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células nucleadas pequeñas. Las células de este estado de segmentación son denominadas **blastómeras**. En la mayoría de las especies (los mamíferos constituyen la principal excepción), la velocidad de división celular y la localización de las blastómeras entre sí están bajo el completo control de proteínas y mRNA almacenados en el ovocito por la madre. Durante la segmentación, el volumen citoplasmático no se incrementa. En su lugar, el enorme volumen del citoplasma del cigoto es dividido

* *Nota de traductor:* el término segmentación puede utilizarse en dos sentidos importantes: 1) hacer referencia al período, etapa o proceso de desarrollo que se produce finalizada la fecundación hasta el inicio de la gastrulación; 2) indicar la escisión o separación del citoplasma entre dos células durante la división celular.

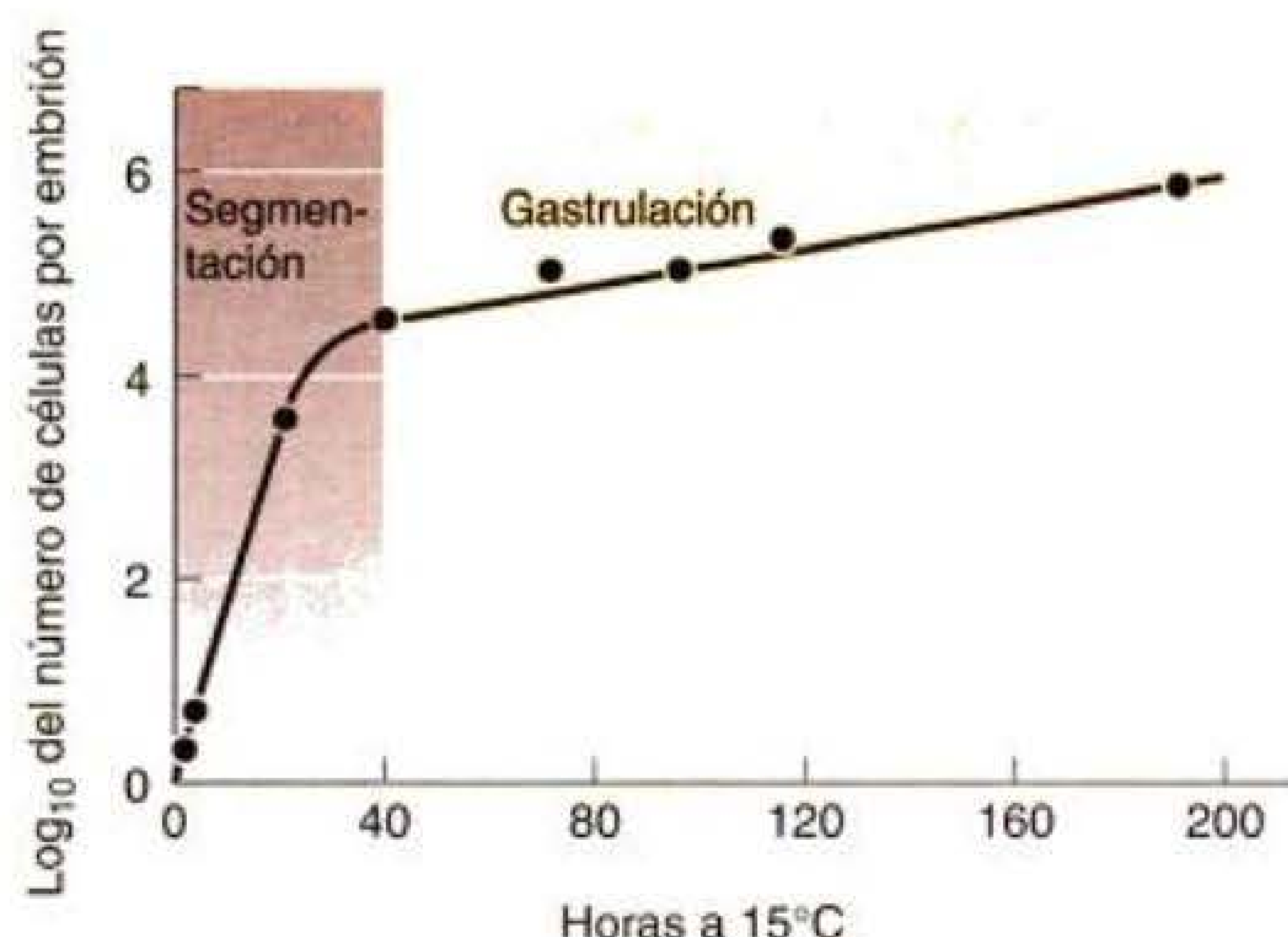


Fig. 8-1. Velocidad de formación de nuevas células durante el desarrollo temprano de la rana *Rana pipiens.* (Según Sze 1953.)

en células cada vez más pequeñas. En primer lugar el cigoto es dividido en la mitad, luego en cuartos, luego en octavos, y así sucesivamente. Esta división del citoplasma sin incremento del volumen se lleva a cabo mediante la abolición del período de crecimiento entre las divisiones (esto es, las fases G_1 y G_2 del ciclo celular). Mientras tanto, la segmentación de los núcleos se produce a una rápida velocidad nunca vista (ni siquiera en las células tumorales). Por ejemplo, un cigoto de rana puede dividirse en 37.000 células en tan solo 43 horas. La mitosis en la segmentación de los embriones de *Drosophila* se produce cada 10 minutos durante más de dos horas y en tan solo 12 horas forma aproximadamente 50.000 células. Este espectacular incremento en el número celular puede ser apreciado al comparar la segmentación con otros estadios del desarrollo. La figura 8-1 muestra el logaritmo del número de células en un embrión de rana trazado contra el tiempo de desarrollo (Sze 1953). Esto ilustra una discontinuidad muy marcada entre la segmentación y la gastrulación.

Desde la fecundación a la segmentación

La transición desde la fecundación a la segmentación es causada por la activación del **factor promotor de la mitosis (FPM).** El FPM fue descubierto primeramente como el principal factor responsable para la reanudación de las divisiones celulares meióticas en los ovocitos II ovulados por la rana. Éste continúa teniendo un papel durante la fecundación, regulando el ciclo celular bifásico de las blastómeras tempranas. Las blastómeras en general progresan a través de un ciclo celular que consiste en tan solo dos etapas: M (mitosis) y S (síntesis de DNA) (fig. 8-2). Gerhart y col. (1984) demostraron que el FPM experimenta cambios cíclicos en su nivel de actividad en las células mitóticas. La actividad del FPM de las blastómeras tempranas es la más alta durante M e indetectable durante S.

Newport y Kirschner (1984) demostraron que la replicación del DNA (S) y la mitosis (M) son manejadas únicamente por el aumento o la pérdida de la actividad del FPM. Las células que están en segmentación pueden ser retenidas experimentalmente en la fase S al incubarlas con un inhibidor de la síntesis de proteínas. Cuando el FPM es microinyectado en las células, éstas ingresan en la fase M. Desaparecen sus envolturas nucleares y la cromatina se condensa a cromosoma. Después de una hora, el FPM es degradado y los cromosomas retornan a la fase S.

¿Qué provoca esta actividad cíclica del FPM? El factor promotor de la mitosis contiene dos subunidades. La subunidad mayor es denominada **ciclina B.** Éste es el componente que muestra un comportamiento periódico,

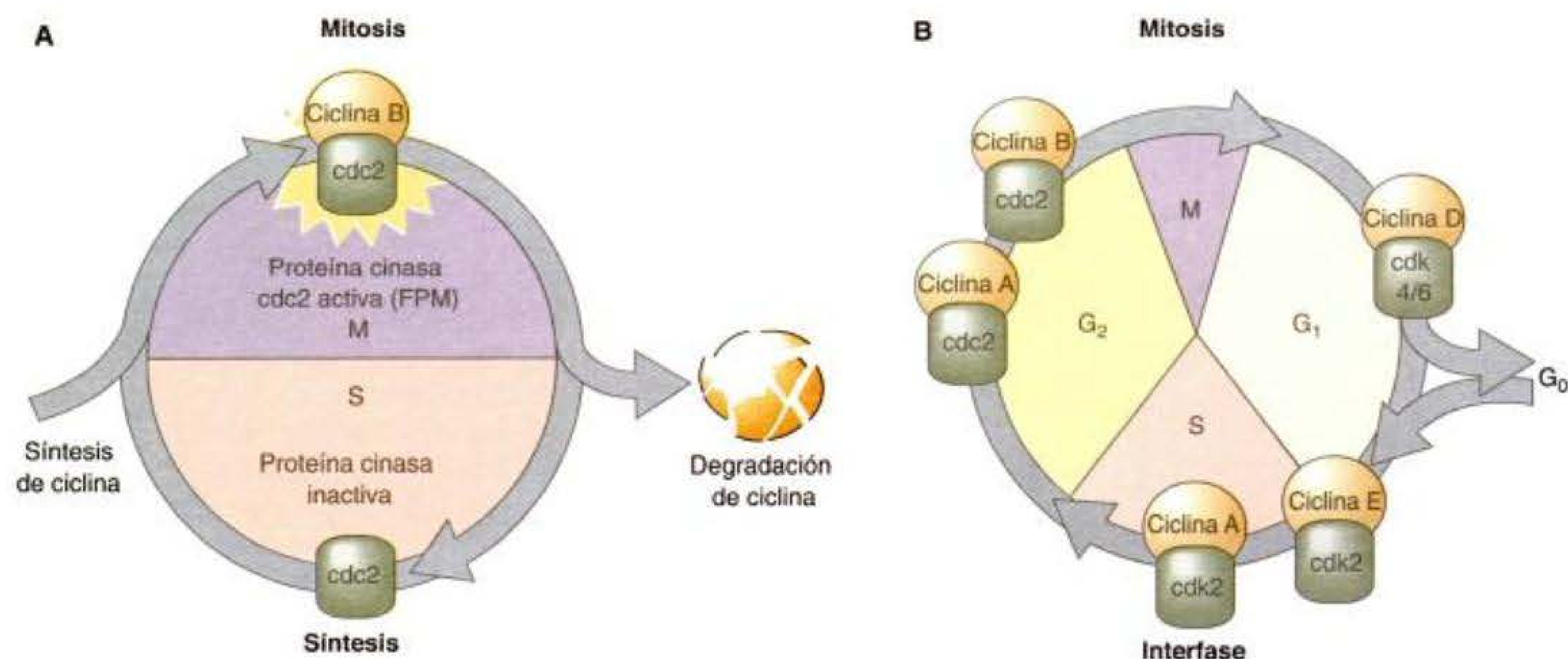


Fig. 8-2. Ciclos celulares de las células somáticas y de las blastómeras tempranas. **A.** El ciclo celular bifásico simple de las blastómeras tempranas de anfibio tiene solo dos etapas, S y M. La síntesis de ciclina B permite la progresión a M (mitosis), mientras que la degradación de ciclina B le permite a las células pasar hacia la fase S (síntesis). **B.** Ciclo celular de una célula somática típica. La mitosis (M) es seguida por una etapa de "interfase". Este último periodo está subdividido en las fases G_1, S (síntesis) y G_2. Las células que están diferenciándose se hallan generalmente "retiradas" del ciclo celular y están en una fase G_1 prolongada denominada G_0. Las ciclinas responsables de la progresión a lo largo del ciclo celular y sus respectivas cinasas son mostradas en el punto de regulación del ciclo celular. (B, según Nigg 1995.)

acumulándose durante S y siendo degradado después que las células han alcanzado M (Evans y col. 1983; Swenson y col. 1986). La ciclina B es frecuentemente codificada por mRNA almacenados en el citoplasma del ovocito y si se inhibe específicamente la traducción de este mensaje, la célula no entrará en la mitosis (Minshull y col. 1989) La aparición y degradación cíclica de la ciclina B es un factor clave en la regulación mitótica. La ciclina B regula a la subunidad menor del FPM, la **cinasa dependiente de ciclina.** Esta cinasa activa la mitosis mediante la fosforilación de varias proteínas de interés, incluidas las histonas, las proteínas de la lámina de la envoltura nuclear y de la subunidad regulatoria de la miosina citoplasmática. Estas acciones producen la condensación de la cromatina, la despolimerización de la envoltura nuclear y la organización del huso mitótico.

Sin la ciclina B, la cinasa dependiente de ciclina no podrá funcionar. La presencia de ciclina es controlada por varias proteínas que aseguran su síntesis y degradación periódica. En la mayoría de las especies estudiadas, los reguladores de la ciclina B (y por lo tanto del FPM) están almacenados en el citoplasma del cigoto. Por lo tanto, el ciclo celular es independiente del genoma nuclear durante numerosas divisiones celulares. Estas divisiones tempranas tienden a ser rápidas y sincrónicas. Sin embargo, a medida que los componentes citoplasmáticos son consumidos, el núcleo comienza a sintetizarlos. El embrión ingresa ahora en la **transición de blástula media,** en la que varios fenómenos son incorporados a las divisiones celulares bifásicas del embrión. En primer lugar, se agregan al ciclo celular las fases "brecha o espacio" (G_1 y G_2; G: del inglés *gap*), que permiten a las células crecer (fig. 8-2B). (Recordar que antes de este momento, el citoplasma estaba dividiéndose entre células cada vez más y más pequeñas, pero el volumen total del organismo se mantenía sin cambios.) Los embriones de *Xenopus* incorporan las fases G_1 y G_2 al ciclo celular poco después de la duodécima segmentación. *Drosophila* agrega a G_2 durante el decimocuarto ciclo y a G_1 durante el decimoséptimo ciclo (Newport y Kirschner 1982a; Edgar y col. 1986). En segundo lugar, se pierde la sincronicidad de la división celular, debido a que diferentes células sintetizan distintos reguladores del FPM. En tercer lugar, se transcriben nuevos mRNA. Muchos de estos mensajeros codifican proteínas que llegarán a ser necesarias para la gastrulación. En muchas especies, si la transcripción es bloqueada la división celular se producirá a un ritmo y tiempo normales, pero el embrión no será capaz de comenzar la gastrulación.

SITIO WEB 8.1 **La regulación del ciclo celular (Regulating the cell cycle).** Las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas son críticas en la regulación de la división celular y de su integración con las actividades de la envoltura nuclear y de la síntesis de DNA.

Mecanismos citoesqueléticos de la mitosis

La segmentación es en realidad el resultado de dos procesos cíclicos coordinados. El primero es la **cariocinesis**: la división mitótica del núcleo. El agente mecánico de la cariocinesis es el **huso mitótico**, con sus microtúbulos compuestos de tubulina (el mismo tipo de proteína que forma el flagelo del espermatozoide). El segundo proceso es la **citocinesis**: la división de la célula. El agente mecánico de la citocinesis es un **anillo contráctil** de microfilamentos de actina (el mismo tipo de proteína que extiende la microvellosidad del gameto femenino y del proceso acrosómico del espermatozoide). El cuadro 8-1 presenta una comparación de estos agentes de la división celular. La relación y coordinación entre estos dos sistemas durante la segmentación está representada en la figura 8-3A, en la que se muestra al cigoto del erizo de mar experimentando su primera segmentación. El huso mitótico y el anillo contráctil son perpendiculares entre sí, y el huso es interno al anillo contráctil. Este último crea un **surco de segmentación**, que finalmente biseca el plano de la mitosis, creando de este modo dos blastómeras genéticamente equivalentes.

Los microfilamentos de actina se encuentran en la corteza (citoplasma externo) del cigoto más que en el citoplasma central. Bajo el microscopio electrónico, el anillo de microfilamentos puede ser visto formando una banda cortical definida de 0,1 μm de ancho (fig. 8-3B). Este anillo contráctil existe únicamente durante la segmentación y se extiende unos 8-10 μm hacia el centro del cigoto; es el responsable de ejercer la fuerza que divide el cigoto en blastómeras; si éste es alterado, se detiene la citocinesis. Schroeder (1973) comparó el anillo contráctil con una "cuerda de fruncido intercelular," apretándose sobre el cigoto a medida que continúa la segmentación. Este estrechamiento del anillo de microfilamentos crea un surco de segmentación. Los microtúbulos también son vistos cerca del surco de segmentación (además de su papel en la generación del huso mitótico), debido a que son necesarios para traer material de membrana al sitio de adición de membrana (Danilchik y col. 1998).

Aunque la cariocinesis y la citocinesis están generalmente coordinadas, a veces son separadas por condiciones

Cuadro 8-1 *Cariocinesis y citocinesis*

Proceso	*Agente mecánico*	*Principal composición proteica*	*Localización*	*Principal fármaco disruptivo*
Cariocinesis	Huso mitótico	Microtúbulos de tubulina	Citoplasma central	Colchicina, nocodazol[a]
Citocinesis	Anillo contráctil	Microfilamentos de actina	Citoplasma cortical	Citocalasina B

[a] Debido a que se ha hallado que la colchicina inhibe independientemente varias funciones de membrana, que incluyen la osmorregulación y el transporte de iones y nucleósidos, nocodazol se ha convertido en la principal droga utilizada para inhibir los procesos mediados por microtúbulos (véase Hardin 1987).

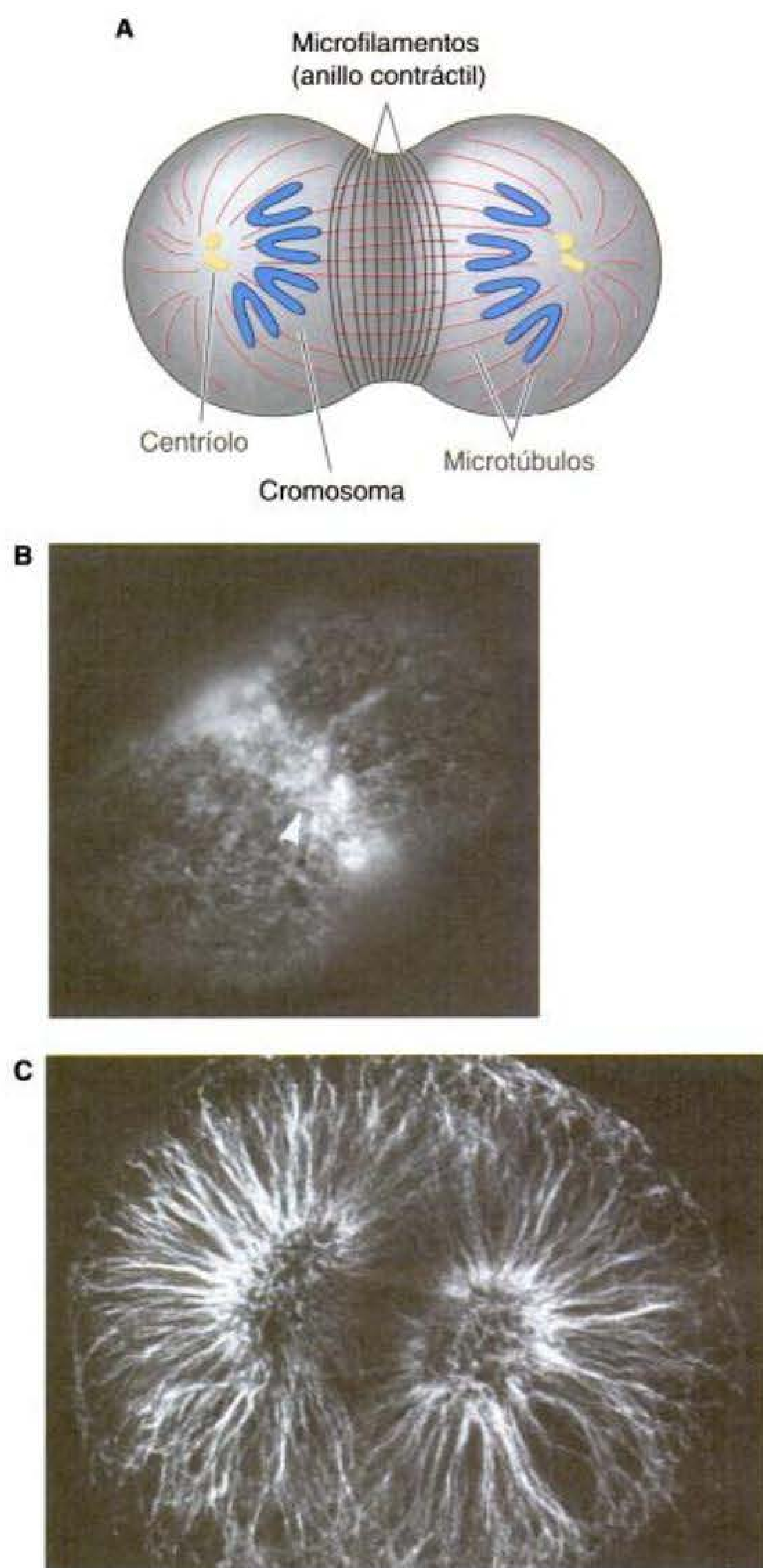


Fig. 8-3. Papel de los microtúbulos y de los microfilamentos en la división celular. (A) Esquema de la telofase de la primera segmentación. Los cromosomas están acercándose hacia los centríolos por los microtúbulos, mientras que el citoplasma se está estrechando por la contracción de los microfilamentos. (B) La marcación fluorescente de los microfilamentos de actina muestra el anillo de contracción en el surco de la primera segmentación (cabeza de flecha) de una telofase de un cigoto de erizo de mar. (C) La marcación fluorescente de tubulina muestra a los ásteres de microtúbulos del cigoto del erizo de mar durante la telofase de la primera segmentación. (B, de Bonder y col. 1988; C de White y col. 1988; fotografías cortesía de los autores.)

naturales o experimentales. En los cigotos de insecto, la cariocinesis se produce varias veces antes de que tenga lugar la citocinesis. Otro modo de producir este estado es tratar a los embriones con la droga citocalasina B. Esta droga inhibe la formación y organización de los microfilamentos en el anillo contráctil, deteniendo de este modo la segmentación sin detener la cariocinesis (Schroeder 1972).

Patrones de segmentación embrionaria

En 1923, el embriólogo E. B. Wilson reflexionó sobre lo poco que conocemos acerca de la segmentación: "Para nuestra limitada inteligencia, parecería una tarea simple dividir al núcleo en partes iguales. La célula, evidentemente, alberga una opinión muy diferente". En efecto, distintos organismos experimentan la segmentación de modos claramente diferentes. El patrón de segmentación embrionario característico de una especie es determinado por dos parámetros principales: 1) la cantidad y distribución de la proteína vitelina dentro del citoplasma y 2) los factores en el citoplasma del cigoto que influyen sobre el ángulo del huso mitótico y el tiempo de su formación.

La cantidad y distribución de vitelo determina dónde puede producirse la segmentación y el tamaño relativo de las blastómeras. Cuando un polo del cigoto está relativamente libre de vitelo, la división celular se produce allí a una velocidad más rápida que en el polo opuesto. El polo rico en vitelo es referido como el **polo vegetal**; la concentración de vitelo en el **polo animal** es relativamente baja. El núcleo del cigoto es desplazado frecuentemente hacia el polo animal. En general, el vitelo inhibe la segmentación. La figura 8-4 proporciona una clasificación de los tipos de segmentación y muestra la influencia del vitelo en el patrón y en la simetría de la segmentación.

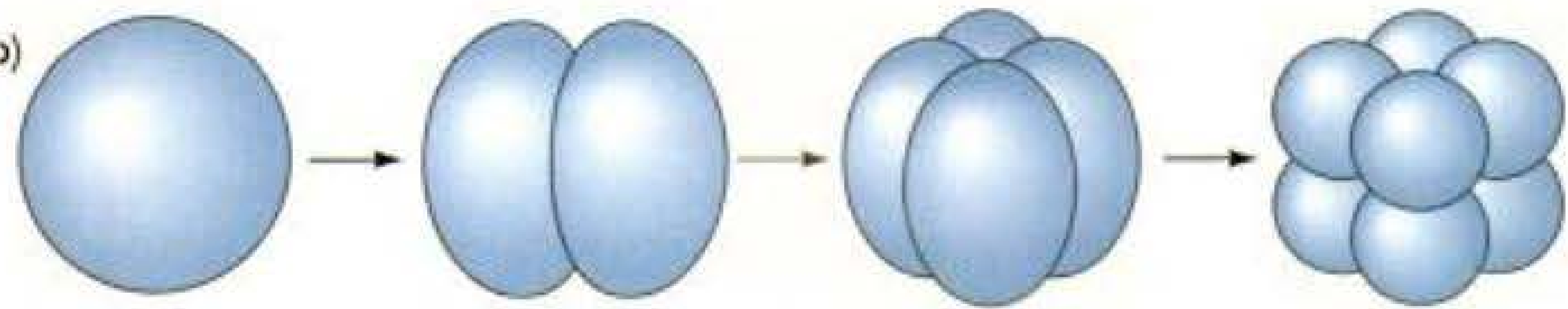
En un extremo están los cigotos o células huevo de los erizos de mar, mamíferos y caracoles. Estos cigotos tienen escaso vitelo equitativamente distribuido y son por lo tanto **isolecíticos** (griego, "vitelo igual"). En estas especies, la segmentación es **holoblástica** (griego *holos*, completa), lo que significa que el surco de segmentación se extiende a través de la totalidad del cigoto. Con poco vitelo, los embriones deben contar con algún otro medio para obtener nutrientes. La mayoría generará una forma larval voraz, mientras que los mamíferos obtienen su nutrición a partir de la placenta materna.

En el otro extremo están los cigotos de insectos, peces, reptiles y aves. La mayor parte del volumen de estas células está compuesta de vitelo. El vitelo debe ser suficiente para nutrir a estos animales durante todo el desarrollo embrionario. Los cigotos que contienen grandes acumulaciones de vitelo experimentan una segmentación **meroblástica** (griego *meros*, parte), por la que solamente una porción del citoplasma es segmentada. El surco de segmentación no penetra en la porción vitelínica del citoplasma debido a que las placas de vitelo dificultan en estos sitios la formación de membrana. Los cigotos de insecto tienen su vitelo en el centro (es decir, son **centrolecíticos**) y se producen divisiones del citoplasma solo en el aro de citoplasma alrededor de la periferia de la célula (es decir, **segmentación superficial**). Los cigotos de aves y peces tienen solo una pequeña área del cigoto que está libre de vitelo (cigotos **telolecíticos**), y por lo tanto, las divisiones celulares se producen solamente en este pequeño disco de citoplasma, dando origen a un patrón de segmentación **discoidal**. No obstante, éstas son reglas generales y especies estrechamente relacionadas pueden desarrollar distintos patrones de segmentación en diferentes ambientes.

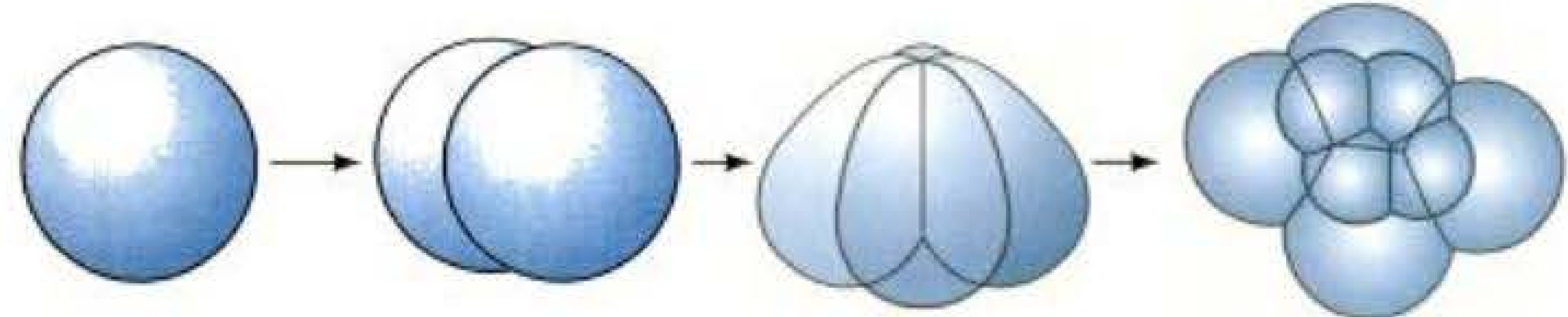
I. SEGMENTACIÓN HOLOBLÁSTICA (COMPLETA)

A. **Isolecítica**
(Escaso vitelo equitativamente distribuido)

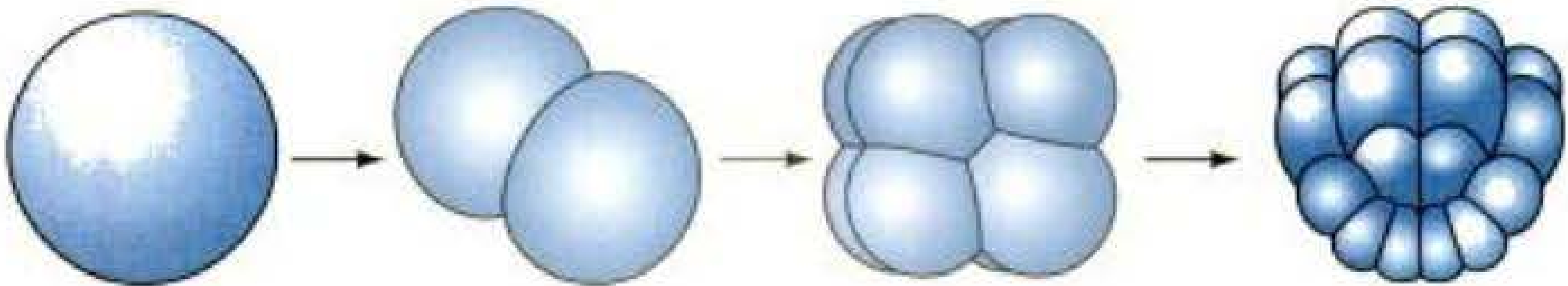
1. Segmentación radial
Equinodermos, anfioxo



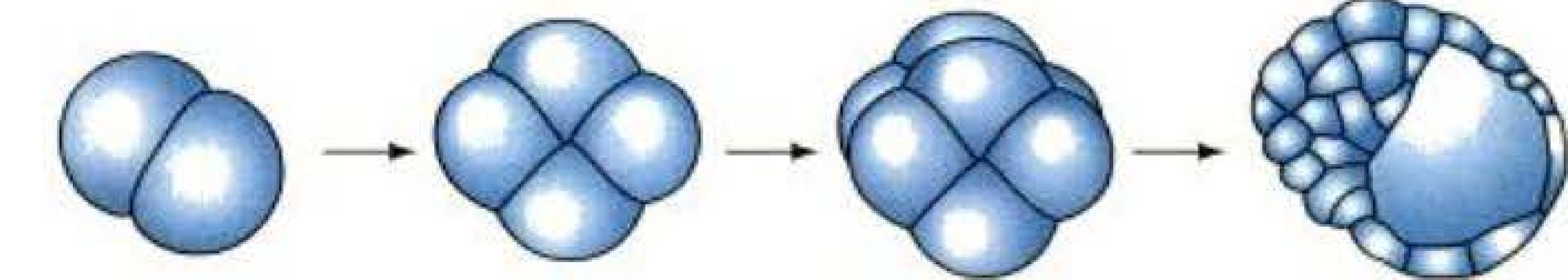
2. Segmentación espiral
Anélidos, moluscos, gusanos planos



3. Segmentación bilateral
Tunicados

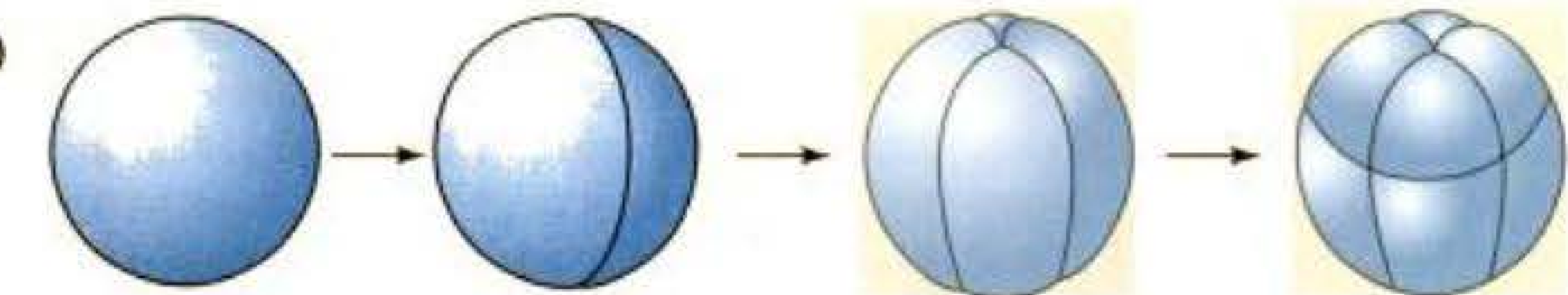


4. Segmentación rotacional
Mamíferos, nematodos



B. **Mesolecítica**
(Disposición vegetal del vitelo moderada)

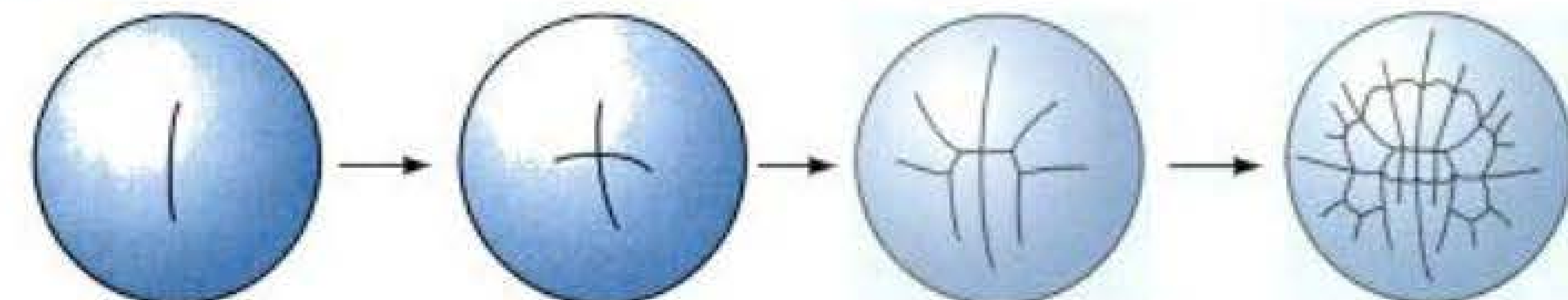
Segmentación radial desplazada
Anfibios



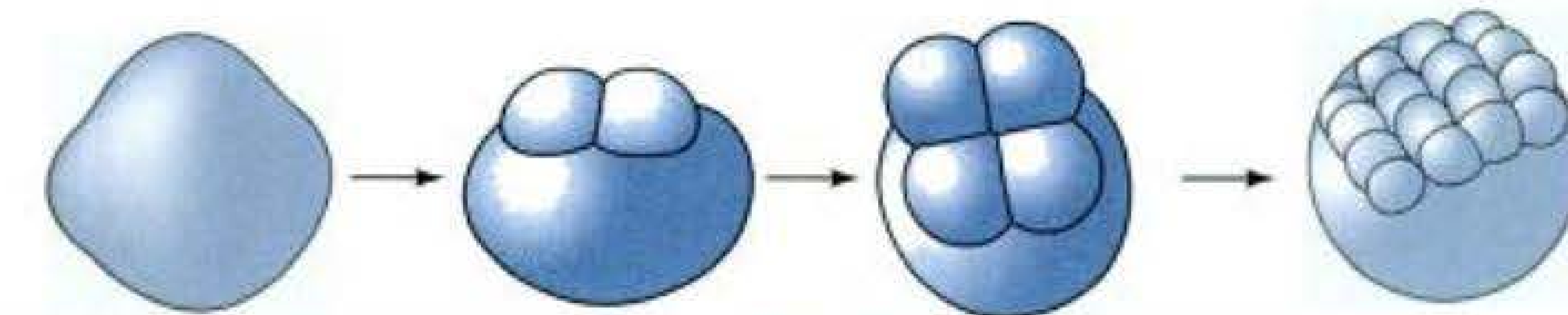
II. SEGMENTACIÓN MEROBLÁSTICA (INCOMPLETA)

A. **Telolecítica**
(Vitelo denso a lo largo de la mayor parte de la célula)

1. Segmentación bilateral
Moluscos cefalópodos



2. Segmentación discoidal
Peces, reptiles, aves



B. **Centrolecítica**
(Vitelo en el centro del cigoto)

Segmentación superficial
La mayoría de los insectos



Fig. 8-4. Resumen de los principales patrones de segmentación.

Sin embargo, el vitelo es solo uno de los factores que influyen en el patrón de segmentación de las especies. Hay también patrones heredados de división celular que están superpuestos a las limitaciones del vitelo. Esto puede verse fácilmente en los cigotos isolecíticos, en los que hay muy poco vitelo. Ante la ausencia de una gran concentración de vitelo, pueden observarse cuatro tipos principales de segmentación: patrones de segmentación radial holoblástica, espiral holoblástica, bilateral holoblástica y rotacional holoblástica. Se verán ejemplos de estos

patrones de segmentación más adelante cuando se analice de un modo más detallado el desarrollo temprano de cuatro grupos de invertebrados diferentes.

VADE MECUM[2]. **Patrones de segmentación (Cleavage patterns).** Las cantidades de vitelo dentro de la célula huevo o cigoto influyen en el patrón de segmentación. Los cigotos de varios organismos estudiados comúnmente en biología del desarrollo ilustran esta característica y son vistos en fotografías marcadas y en películas de lapso de tiempo. **[Hacer clic sobre Sea Urchin; Fruit Fly; Chick-Early y Amphibian]**

Especificación de los destinos celulares durante la segmentación

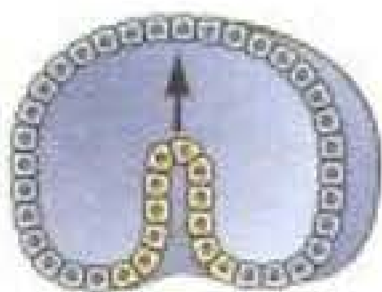
Los destinos celulares pueden especificarse mediante interacciones célula-célula o mediante la distribución asimétrica de patrones de moléculas en células particulares. Estas moléculas distribuidas de manera desigual generalmente son factores de transcripción que activan o reprimen la transcripción de genes específicos en aquellas células que los adquieren. Tales distribuciones asimétricas de patrones de moléculas pueden ocurrir durante la segmentación y en general siguen uno de los tres mecanismos: 1) las moléculas son unidas al citoesqueleto del gameto femenino (será un cigoto al ser fecundado) y las células que obtienen el citoplasma las adquieren pasivamente; 2) las moléculas son transportadas activamente a lo largo del citoesqueleto de una célula particular; o 3) las moléculas llegan a asociarse con un centrosoma específico y siguen al centrosoma de una de las dos células hijas mitóticas (Lambert y Nagy 2002). Una vez que se ha establecido la asimetría, una célula puede especificar a una célula vecina mediante interacciones paracrinas o yuxtacrinas sobre la superficie celular (véase cap. 6).

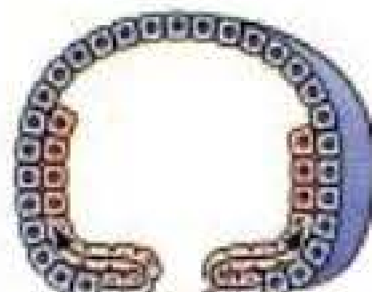
Gastrulación

La gastrulación es el proceso de migraciones celulares y tisulares altamente coordinado por medio del cual las células de la blástula se reorganizan de manera espectacular. La blástula consiste en numerosas células, cuyas posiciones fueron establecidas durante la segmentación. Durante la gastrulación, estas células obtienen nuevas posiciones y nuevos vecinos, y se establece el plan corporal de múltiples capas. Las células que formarán los órganos mesodérmicos y endodérmicos son llevadas hacia el interior del embrión, mientras que las células que formarán la piel (epidermis) y el sistema nervioso se extienden sobre la superficie exterior (véase cap. 2). Por lo tanto, las tres capas germinales –ectodermo externo, endodermo interno y mesodermo intersticial– se producen por primera vez durante la gastrulación. Además, en esta etapa se dan las condiciones para las interacciones de estos tejidos posicionados recientemente.

Los movimientos de la gastrulación involucran al embrión en su totalidad y las migraciones de las células en una parte del embrión que está gastrulando deben estar íntimamente coordinadas con otros movimientos que se producen simultáneamente. Aunque los patrones de la gastrulación tienen una enorme variación a lo largo del reino animal, hay tan solo unos pocos tipos básicos de movimiento celular. La gastrulación generalmente involucra alguna combinación de los siguientes tipos de movimientos (fig. 8-5):

- **Invaginación.** Plegamiento hacia adentro de una región de células, de un modo muy parecido a la hendidura que se forma en una pelota de goma desinflada cuando es empujada hacia adentro.
- **Involución.** Movimiento de girar hacia adentro de una capa celular en expansión de modo tal que se extiende por la superficie interna de las restantes células externas.
- **Ingresión.** Migración de células individuales de la capa superficial hacia el interior del embrión. Las células se convierten en mesenquimáticas (separadas) y migran en forma independiente.
- **Delaminación.** Separación de una lámina celular en dos láminas más o menos paralelas. Mientras que sobre bases celulares ésta recuerda a la ingresión, el resultado es la formación de una nueva lámina de células.
- **Epibolia.** Movimiento de las láminas epiteliales (generalmente de las células ectodérmicas) que se despliegan como una unidad, en lugar de individualmente, para envolver las capas profundas del embrión. La epibolia puede producirse mediante la división celular, por el cambio de la forma celular, o a través de la intercalación de varias capas en menos capas. A menudo, se utilizan los tres mecanismos.









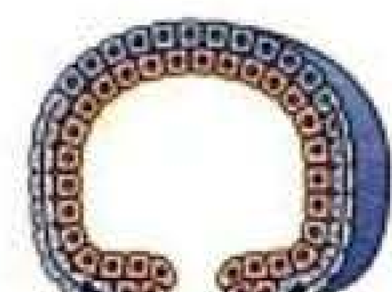


Fig. 8-5. Tipos de movimientos celulares durante la gastrulación. La gastrulación de cualquier organismo en particular es un ensamblaje de varios de estos movimientos.

VADE MECUM[2]. **Movimientos de la gastrulación (Gastrulation movements).** Este segmento muestra películas de la gastrulación en varios organismos, en los que el código de color de las láminas germinales ha sido superpuesto sobre el embrión vivo así como en los modelos tridimensionales.
[Hacer clic sobre Sea Urchin; Fruit Fly; Chick-Mid y Amphibian]

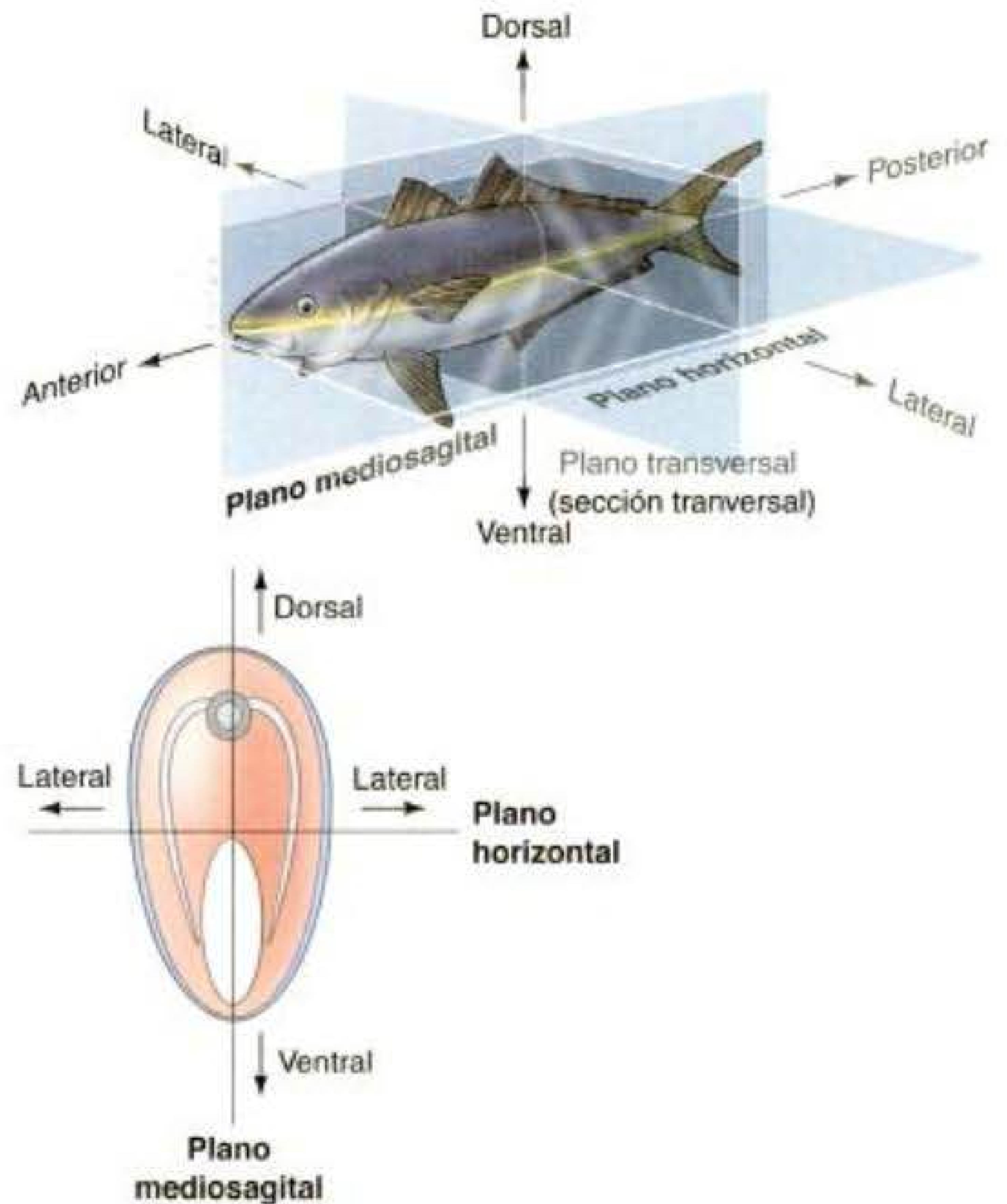


Fig. 8-6. Ejes de un animal simétrico bilateralmente. Un único plano, el plano mediosagital, divide al animal en las mitades derecha e izquierda. Las secciones transversales se realizan a lo largo del eje anteroposterior.

Especificación celular y formación de ejes

Los embriones deben desarrollar tres ejes decisivos que constituyen las bases del cuerpo: el eje anteroposterior, el eje dorsoventral y el eje derecha-izquierda (fig. 8-6).

El **eje anteroposterior** es la línea que se extiende desde la cabeza a la cola (o de la boca al ano en los organismos que carecen de cabeza y cola). El **eje dorsoventral** es la línea que se extiende desde la espalda (dorso) al abdomen (vientre). Por ejemplo, en los vertebrados, el tubo neural es una estructura dorsal. En los insectos, el cordón neural es una estructura ventral. El **eje derecha-izquierda** es una línea entre los dos lados laterales del cuerpo. Aunque los seres humanos (por ejemplo) podrían parecer simétricos, se debe recordar que en la mayoría, el corazón y el hígado están solamente en la mitad izquierda del cuerpo. De algún modo, el embrión sabe que algunos órganos pertenecen a un lado y otros órganos al otro.

En este capítulo se analizará cómo cuatro invertebrados –el erizo de mar, el tunicado, el caracol y una especie de nematodo– experimentan la segmentación, la gastrulación, la especificación de ejes y la determinación del destino celular. Estos cuatro invertebrados fueron elegidos debido a que han sido importantes **sistemas modelo** para los biólogos del desarrollo. En otras palabras, pueden ser fácilmente estudiados en el laboratorio, y tienen propiedades especiales que permiten la observación fácil de sus mecanismos de desarrollo. También representan a una amplia variedad de tipos de segmentación, patrones de gastrulación y modos de especificación de ejes y de destinos celulares.* A pesar de sus diferencias, estos embriones de invertebrados están caracterizados por lo que Eric Davidson (2001) denominó "Embriogénesis tipo I" (véase cap. 3), que incluye:

- La activación inmediata de los genes del cigoto.
- La especificación rápida de las blastómeras por los productos de los genes del cigoto y por genes activos maternamente.
- El número relativamente pequeño de células (unos pocos cientos o menos) en la gastrulación.

* Sin embargo, los sistemas modelo –por su mayor capacidad para desarrollarse en el laboratorio– a veces impiden poder hacernos ciertas preguntas concernientes a la relación del desarrollo con su hábitat. Estas preguntas serán tratadas en el capítulo 22.

DESARROLLO TEMPRANO DE LOS ERIZOS DE MAR

Segmentación en erizos de mar

Los erizos de mar presentan **segmentación holoblástica radial**. Las primeras siete divisiones son "esterotípicas" en las que se sigue el mismo patrón en cada individuo dentro de una especie. La primera y la segunda segmentación son meridionales y se disponen perpendiculares entre sí. Es decir, los surcos de segmentación pasan a través de los polos animal y vegetal. La tercera segmentación es ecuatorial, perpendicular a los dos primeros planos de segmentación y separa entre sí los hemisferios animal y vegetal (figs. 8-7 y 8-8). Sin embargo, la cuarta segmentación es muy diferente de las primeras tres. Las cuatro células del piso o nivel animal se dividen meridionalmente en ocho blastómeras, cada una con el mismo volumen. Estas ocho células son denominadas **mesómeras.** Sin embargo, el piso o nivel vegetal experimenta una segmentación ecuatorial desigual para producir cuatro células grandes, las **macrómeras** y cuatro **micrómeras** más pequeñas en el polo vegetal (figs. 8-8 y 8-9E; Summers y col. 1993). Cuando las 16 células del embrión se segmentan, las ocho mesómeras "animales" se dividen ecuatorialmente para producir dos niveles, an_1 y an_2, uno encima del otro. Las macrómeras se dividen meridionalmente y forman un nivel de ocho células por debajo de an_2. Las micrómeras también se dividen, aunque un poco más tarde, produciendo un pequeño grupo por debajo del

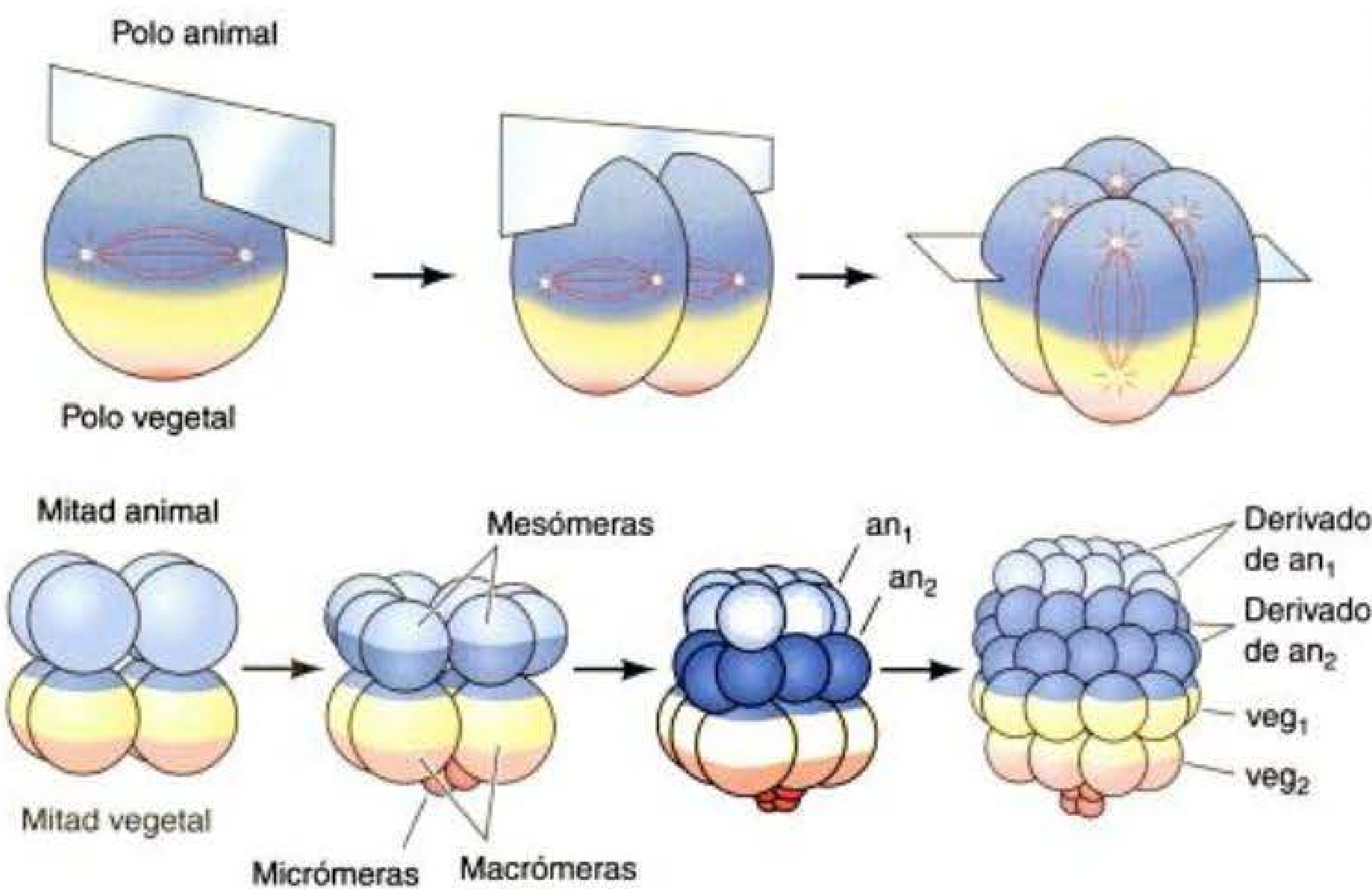


Fig. 8-7. Segmentación en el erizo de mar. Planos de segmentación en las primeras tres divisiones y formación de las hileras de células en las divisiones 3 a 6.

nivel más grande. Durante la sexta segmentación, las células del hemisferio animal se dividen meridionalmente, mientras que las células vegetales se dividen ecuatorialmente; este patrón es revertido en la séptima división. En este momento, el embrión es una blástula de 128 células y el patrón de divisiones llega a ser menos regular.

Formación de la blástula

El estadio de blástula en el erizo de mar en desarrollo comienza durante la etapa de 128 células. Aquí las células forman una esfera hueca que rodea a una cavidad central, o **blastocele** (fig. 8-8D-F). En este momento, todas las células tienen el mismo tamaño, los micrómeros han enlentecido su división celular. Cada una de las células está en contacto con el líquido proteináceo del blastocele sobre el interior y con la capa hialina sobre el exterior. Las uniones estrechas unen las blastómeras que antes estaban conectadas laxamente formando una lámina epitelial continua que rodea completamente el blastocele (Dan-Sohkawa y Fujisawa 1980). A medida que las células continúan dividiéndose, la blástula sigue siendo una capa celular gruesa, adelgazándose mientras se expande. Esto es llevado a cabo mediante la adhesión de las blastómeras a la capa hialina y mediante la afluencia de agua que expande al blastocele (Dan 1960; Wolpert y Gustafson 1961; Ettensohn e Ingersoll 1992).

Estas segmentaciones celulares rápidas e invariables duran hasta la novena o décima división, según la especie. En este momento, las células han llegado a ser especificadas (discutido en la siguiente sección) y terminan desarrollando cilios. La blástula ciliada comienza a rotar dentro de la membrana de fecundación. Poco tiempo después, se observan diferencias en las células. Las células en el polo vegetal de la blástula comienzan a engrosarse, formando una **placa vegetal** (fig. 8-8F). Las células del hemisferio animal sintetizan y secretan una enzima de eclosión que digiere la membrana de fecundación (Lepage y col. 1992). El embrión es ahora una **blástula eclosionada** que nada libremente.

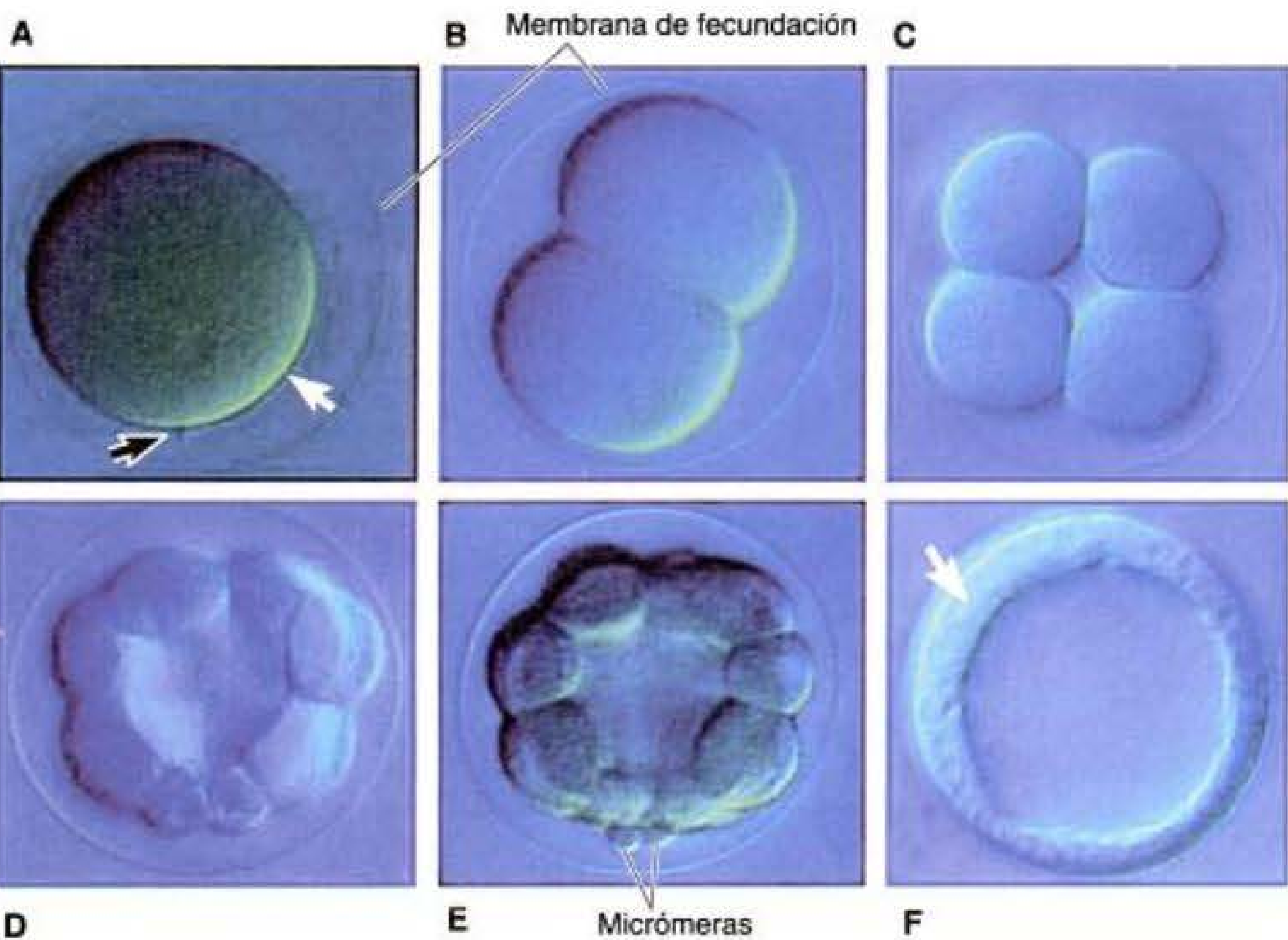


Fig. 8-8. Microfotografías de la segmentación en embriones vivos de erizo de mar *Lytechinus variegatus*, vistas de lado. **A.** Embrión de una célula (cigoto). El sitio de entrada del espermatozoide se indica con una flecha negra, mientras que una flecha blanca señala el polo vegetal. La membrana de fecundación que rodea al embrión es claramente visible. **B.** Estadio de 2 células. **C.** Estadio de 8 células. **D.** Estadio de 16 células. **E.** Estadio de 32 células. Se formaron las micrómeras en el polo vegetal. **F.** La blástula ha hecho la ruptura de la membrana de fecundación (ésta ya no se observa). La futura placa vegetal (flecha) está comenzando a engrosarse. (Fotografías cortesía de J. Hardin.)

Fig. 8-9. Mapa de destino y linaje celular del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus.* **A.** Se muestra un embrión de 60 células, con el lado izquierdo frente al observador. Los destinos de las blastómeras son segregados a lo largo del eje animal vegetal del cigoto. **B.** Mapa de linaje celular del embrión. Para simplificar, solo una de cuatro células embrionarias se muestra más allá de la segunda segmentación (líneas completas). La hilera veg_1 da origen a linajes endodérmico y ectodérmico, y el celoma proviene de dos fuentes: de la segunda hilera de micrómeras y de algunas células veg_2. (Según Wray 1999.)

Mapas de destino y determinación de las blastómeras del erizo de mar

DETERMINACIÓN DEL DESTINO CELULAR. El primero de los mapas de destino de los embriones de erizo de mar siguió a los descendientes de cada una de las blastómeras del estadio de 16 células. Las investigaciones más recientes han refinado estos mapas al seguir el destino de células individuales que han sido inyectadas con marcadores fluorescentes tales como diI. Estos marcadores "brillan" durante muchas divisiones celulares en las progenies de las células inyectadas (véase cap. 1). Tales estudios han demostrado que en el estadio de 60 células, la mayoría de los destinos celulares embrionarios están especificados, pero que las células no están comprometidas de manera irreversible. En otras palabras, blastómeras particulares producen sistemáticamente los mismos tipos celulares en cada embrión, pero estas células se mantienen pluripotentes y pueden dar origen a otros tipos celulares si son colocadas experimentalmente en una parte diferente del embrión.

En la figura 8-9 se muestra un mapa de destino de un embrión de erizo de mar de 60 células (Logan y McClay 1999; Wray 1999). La mitad animal del embrión da origen sistemáticamente al ectodermo; la piel y neuronas de la larva. La capa veg_1 produce células que pueden entrar en los órganos ectodérmicos o endodérmicos. La capa veg_2 da origen a células que pueden poblar tres estructuras diferentes: el endodermo, el celoma (la pared corporal interna) y el mesénquima secundario (células pigmentadas, inmunocitos y células musculares). El primer piso o nivel de micrómeras produce células del mesénquima primario que forman el esqueleto de la larva, mientras que el segundo nivel de micrómeras contribuye con células para el celoma (Logan y McClay 1997, 1999).

Aunque las blastómeras tempranas tienen destinos constantes en la larva, la mayor parte de estos destinos son alcanzados mediante especificación condicional. Las únicas células cuyos destinos son determinados de manera autónoma son las micrómeras esqueletogénicas. Si estas micrómeras son aisladas del embrión y colocadas en tubos de ensayo, todavía formarán espículas esqueléticas. Además, si son trasplantadas a la región animal de la blástula, no solo sus descendientes formarán espículas esqueléticas, sino que las micrómeras trasplantadas alterarán los destinos de las células vecinas al inducir un sitio secundario para la gastrulación. Las células que normalmente deberían haber producido células ectodérmicas de la piel serán reespecificadas como endodermo y producirán un intestino secundario (fig. 8-10; Hörstadius 1973; Ransick y Davidson 1993). Las micrómeras parecen producir una señal que le dice a las células adyacentes que se conviertan en endodermo y las induce a invaginarse dentro del embrión. Su capacidad para reorganizar las células embrionarias es tan pronunciada que si las micrómeras aisladas son recombinadas con un casquete animal aislado (los dos pisos o niveles animales superiores), las células del casquete animal generarán endodermo y se desarrollará una larva más o menos normal (fig. 8-11; Hörstadius 1939).

β-CATENINA Y ESPECIFICACIÓN DE LA MICRÓMERA. Las moléculas señalizadoras involucradas en la especificación celular están comenzando a ser identificadas (Ettensohn y Sweet 2000). La molécula responsable de la especificación de las micrómeras (y su capacidad para inducir a las células vecinas) parece ser la **β-catenina**. Como se vio en el capítulo 6, la β-catenina es un factor de transcripción que es activado con frecuencia por la vía Wnt. Varias piezas de evidencia sugieren que ésta especifica a las micrómeras. En primer lugar, durante el desarrollo normal del erizo de mar, la β-catenina se acumula en los núcleos de las células destinadas a convertirse en endodermo y mesodermo (fig. 8-12A). Esta acumulación es autónoma y puede producirse aun si los precursores de la micrómera son separados del resto del embrión. En segundo lugar, esta acumulación nuclear parece ser responsable de la especificación de la mitad vegetal del embrión. Es posible

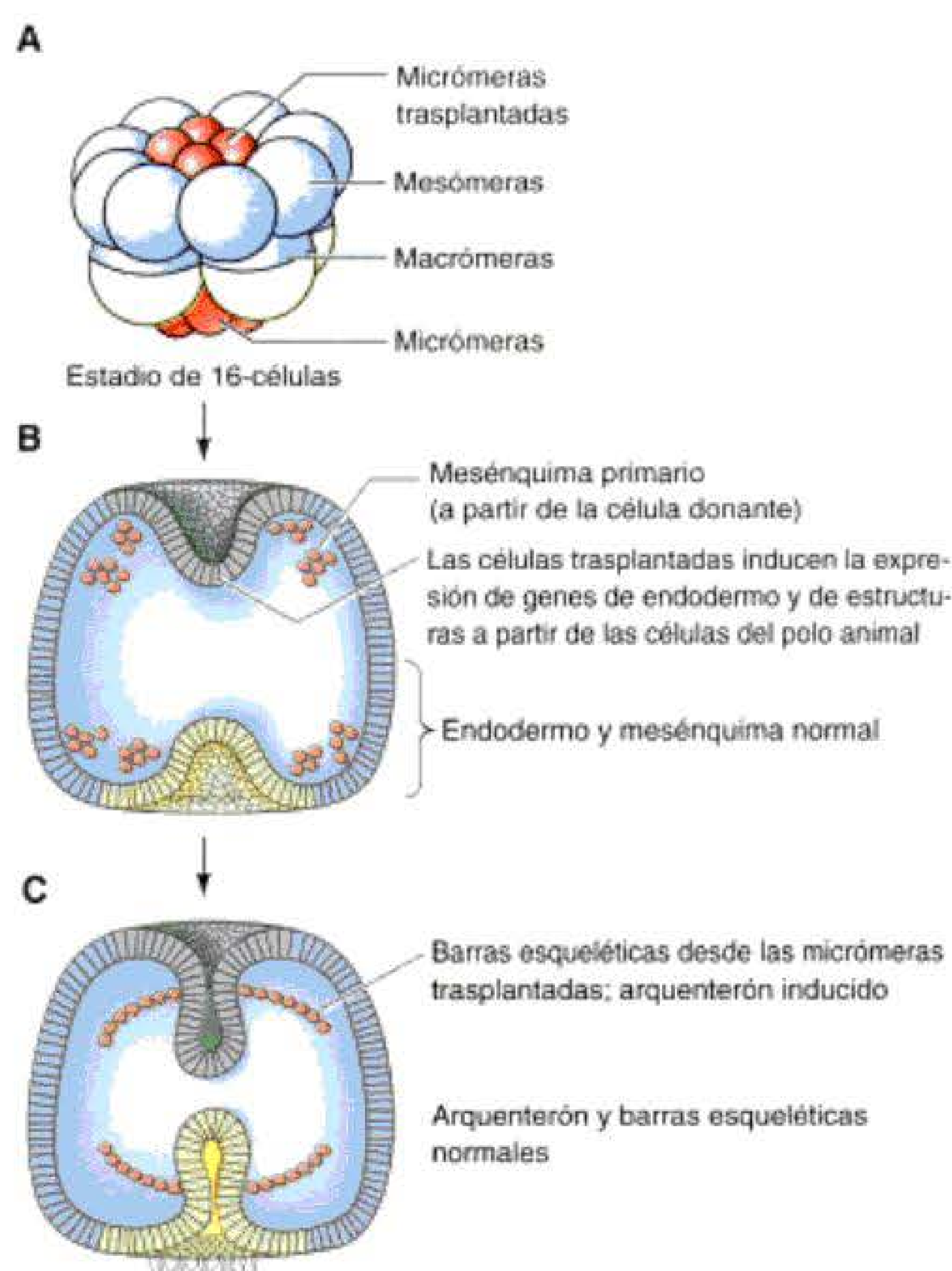


Fig. 8-10. Capacidad de las micrómeras para inducir un eje secundario en los embriones de erizo de mar. **A.** Las micrómeras son trasplantadas desde el polo vegetal de un embrión de 16 células hacia el polo animal de un embrión huésped de 16 células. **B.** Las micrómeras trasplantadas se invaginan en el blastocele para crear un nuevo grupo de células del mesénquima primario, e inducen a las células animales cercanas a ellas a convertirse en células endodérmicas de la placa vegetal. **C.** Las micrómeras trasplantadas se diferencian a cables esqueléticos, mientras que las células del casquete animal inducidas forman un arquenterón secundario. Mientras tanto, la gastrulación avanza normalmente desde la placa vegetal original del huésped. (Según Ransick y Davidson 1993.)

que los niveles de acumulación nuclear de β-catenina ayuden a determinar los destinos mesodérmico y endodérmico de las células vegetales. Tratando a los embriones de erizo de mar con cloruro de litio se provoca la acumulación de β-catenina en cada una de las células, este tratamiento también transforma el ectodermo presuntivo en endodermo. Contrariamente, los procedimientos experimentales que inhiben la acumulación de β-catenina en los núcleos de las células vegetales evitan la formación de endodermo y mesodermo (fig. 8-12B,C; Logan y col. 1998; Wikramanayake y col. 1998).

Finalmente, la β-catenina es esencial para darle a las micrómeras su capacidad inductiva.* Los experimentos descritos en la sección anterior demostraron que las micrómeras eran capaces de inducir un segundo eje embrionario cuando eran trasplantadas al hemisferio animal. Sin embargo, las micrómeras de los embriones en las que se evitó el ingreso en el núcleo de la β-catenina fueron incapaces de inducir a las células animales a formar endodermo y no se formó un segundo eje (Logan y col. 1998). La β-catenina se une a un factor de transcripción TCF en el núcleo, permitiéndole a éste funcionar en la activación del gen (Vonica y col., 2000).

La especificación de las micrómeras por la β-catenina está mediada por el gen ***Pmar1***. Este gen codifica un factor de transcripción homedominio que actúa como un represor transcripcional. El gen que éste reprime es un gen todavía no identificado cuyo producto es un represor general de varios genes que caracterizan a las células mesenquimáticas primarias (fig. 8-13; Oliveri y col. 2002). Como se mencionó antes, uno de los temas del desarrollo animal es que la activación es con frecuencia llevada a cabo a través de la represión de un represor. Algunos de los genes "liberados de la represión" por las acciones del producto *Pmar1* codifican factores de transcripción (como Tbr, Ets y Dri) que dirigen la esqueletogénesis, mientras que otros (como Delta) son responsables de señalizar la capa de células de veg_2 para convertirse en endodermo y mesénquima secundario.

ESPECIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS VEGETALES. En un embrión normal, las células veg_2 son especificadas por tres "ondas" de señales. La primera modera los niveles de β-catenina especificando a las células a ser "endomeso-

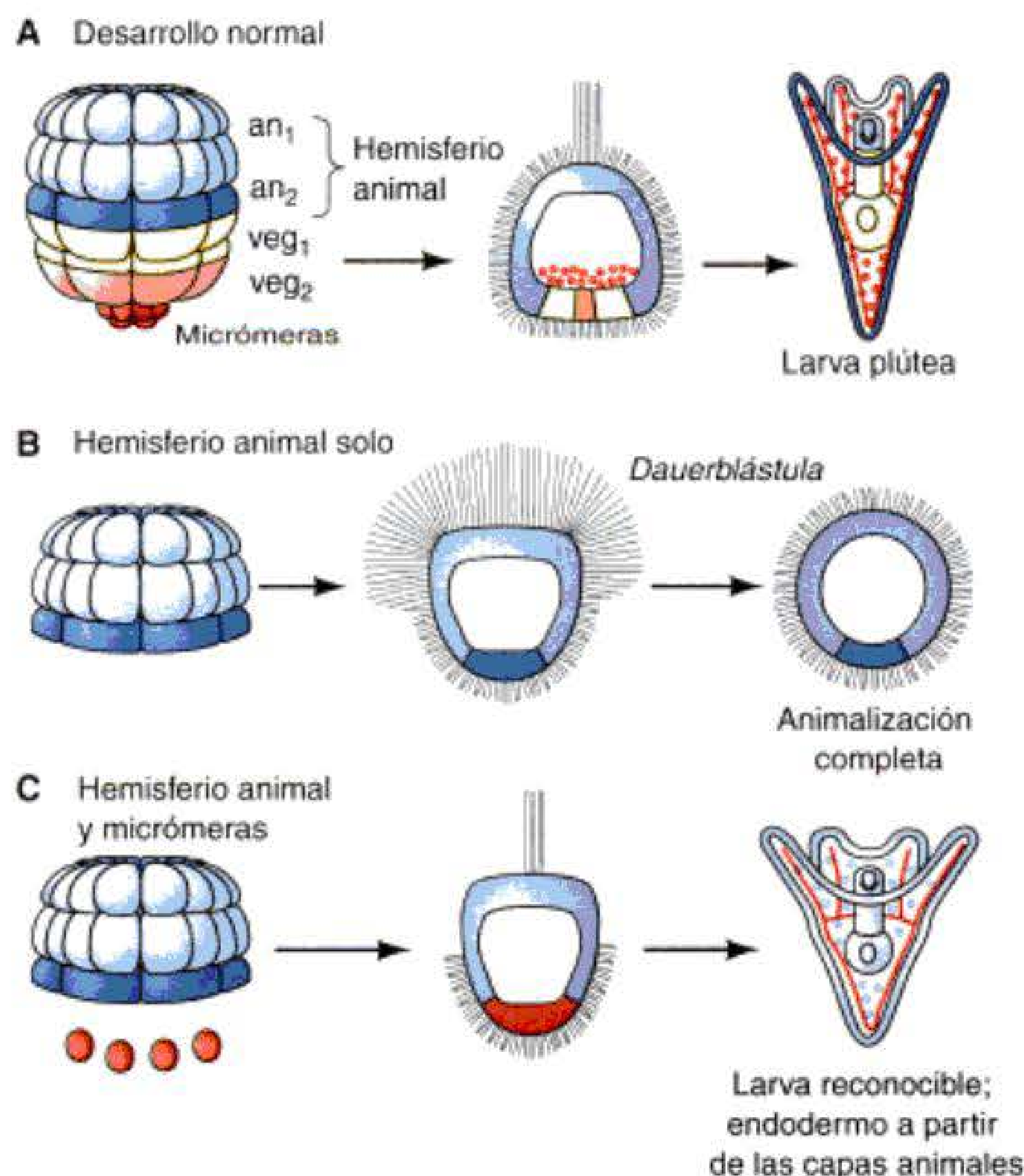


Fig. 8-11. Capacidad de las micrómeras para inducir células ectodérmicas presuntivas a adquirir otros destinos. **A.** Desarrollo normal de un embrión de erizo de mar de 64 células, que muestra los destinos de las diferentes capas. **B.** Un hemisferio animal aislado se convierte en una esfera ciliada de células ectodérmicas. **C.** Cuando un hemisferio animal aislado es combinado con micrómeras aisladas, se forma una larva plútea reconocible, con todos los derivados del endodermo a partir del hemisferio animal. (Según Hörstadius 1939.)

* β-catenina probablemente activa a los genes necesarios para producir la señal inductora, y un ligando de Notch (como Delta) puede ser uno de los componentes de la señal.

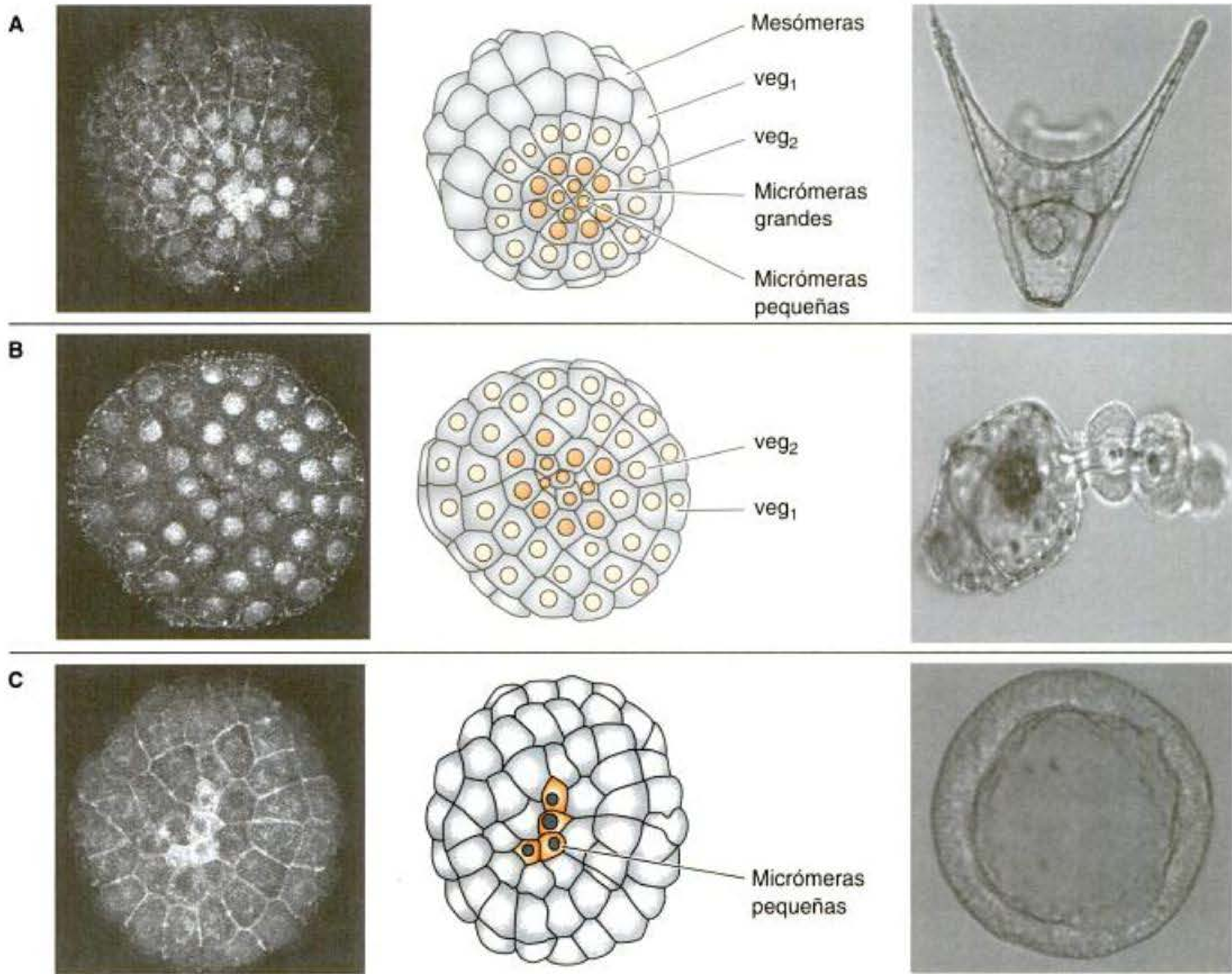


Fig. 8-12. Papel de la β-catenina en la especificación de las células vegetales del embrión de erizo de mar. La β-catenina es teñida por un anticuerpo marcado fluorescentemente. **A.** Durante el desarrollo normal, la β-catenina se acumula predominantemente en las micrómeras y algo menos en las hileras de las células veg_2. **B.** Cuando el tratamiento con cloruro de litio le permite a la β-catenina acumularse en los núcleos de todas las células de la blástula (probablemente por bloqueo de la enzima GSK-3 de la vía de Wnt), las células animales llegan a ser especificadas como endodermo y mesodermo. **C.** Cuando se evita el ingreso de la β-catenina en los núcleos (es decir, ésta permanece en el citoplasma), los destinos de las células vegetales no son especificados y el embrión en su totalidad se desarrolla como una esfera de ectodermo ciliado. (Según Logan y col. 1998; fotografías cortesía de McClay.)

dermo". A continuación dos grupos de señales inductivas se emiten desde las micrómeras. La primera es una "señal veg_2 temprana" secretada por las micrómeras inmediatamente después de su formación en la cuarta segmentación. Esta señal amplifica la especificación del mesendodermo establecida por la β-catenina. Luego, la proteína Delta sobre las micrómeras activa la vía Notch en las células veg_2 adyacentes. La vía Notch hace que estas células lleguen a ser mesénquima secundario en lugar de endodermo. Parece ser que ambas señales son necesarias en este orden particular, y si una no está presente, las células veg_2 fracasan en la producción de mesénquima secundario o endodermo (Ransick y Davidson 1995; Sherwood y McClay 1999; Sweet y col. 1999). Todavía no se conoce la identidad de la señal temprana, pero ésta puede crear competencia en las células veg_2 para responder a la segunda señal. Finalmente, Wnt8 parece ser producido por las células del endodermo (es decir, aquellas células del endomesodermo que *no* reciben la señal Delta). Wnt8 parece actuar de una manera autocrina estimulando la especificación del endodermo (D. McClay, comunicación personal).

DIFERENCIACIÓN: COMBINACIONES DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. Una vez que estos factores de transcripción están presentes en sus regiones específicas, pueden activar los genes que caracterizan a los diferentes tipos celulares en el embrión. Uno de estos genes mejor estudiados es aquel para la proteína endodérmica endo16. Endo16 parece ser un producto secretado de las células endodérmicas y no se conoce su función. Sin embargo, sirve como una proteína marcadora para los tejidos específicos del intestino. Eric Davidson (2001, p. 54) al escribir acerca de la investigación de *endo 16* observó: "Lo que surge es asombroso: una red lógica de interacciones programadas en la secuencia de DNA que asciende esencialmente a un dispositivo integrado computacional". Un resumen de esta lógica computacional se muestra en la figura 8-14. La figura 8-14A resume la especificación del endodermo, mientras que la figura 8-14B muestra una

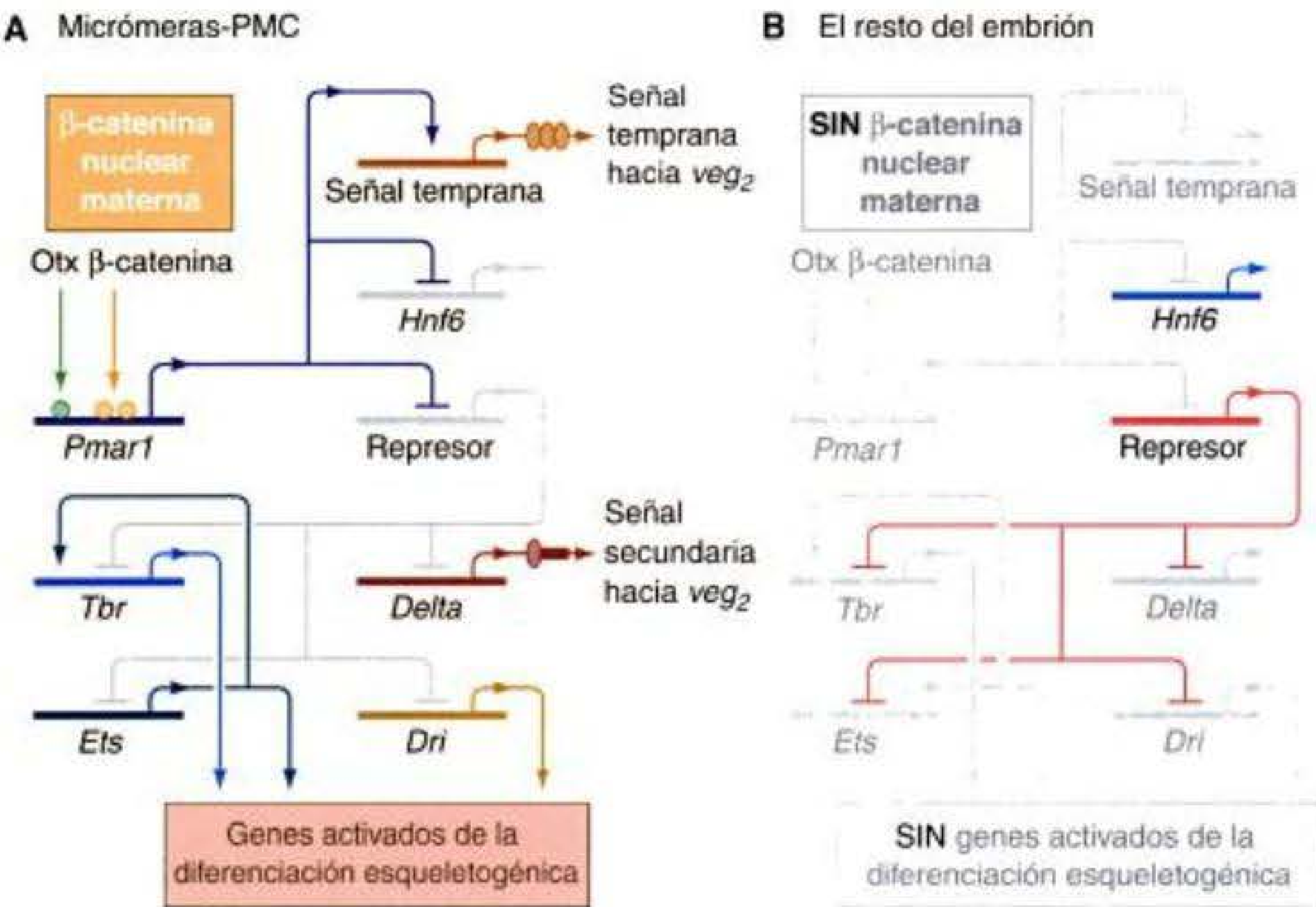


Fig. 8-13. Red regulatoria de las micrómeras propuesta por Davidson y col. (2002). **A.** En los precursores de las células del mesénquima primario en el embrión de 16 células, la β-catenina y el ubicuo factor de transcripción Otx materno activan al gen *Pmar1*. El producto de *Pmar1* es un represor transcripcional que reprime específicamente a un gen que codifica a un "represor global" de numerosos genes que caracterizan a las células del mesénquima primario. Por lo tanto *Pmar1* permite la desrepresión de genes como *Tbr*, *Ets* y *Dri* (que encienden a los genes que forman el esqueleto) y permite la desrepresión de genes que codifican Delta y la "señal veg_2 temprana" (que instruye a la capa veg_2 a formar células de endodermo y de mesénquima secundario). **B.** En todas las otras células del embrión, *Pmar1* no está activado, debido a que β-catenina no es expresada allí y la proteína Otx materna no es translocada hacia aquellas células. Por esta razón, la proteína represora es transcripta y bloquea la activacion de la vía de especificación de la micrómera. (Según Oliveri y col. 2002.)

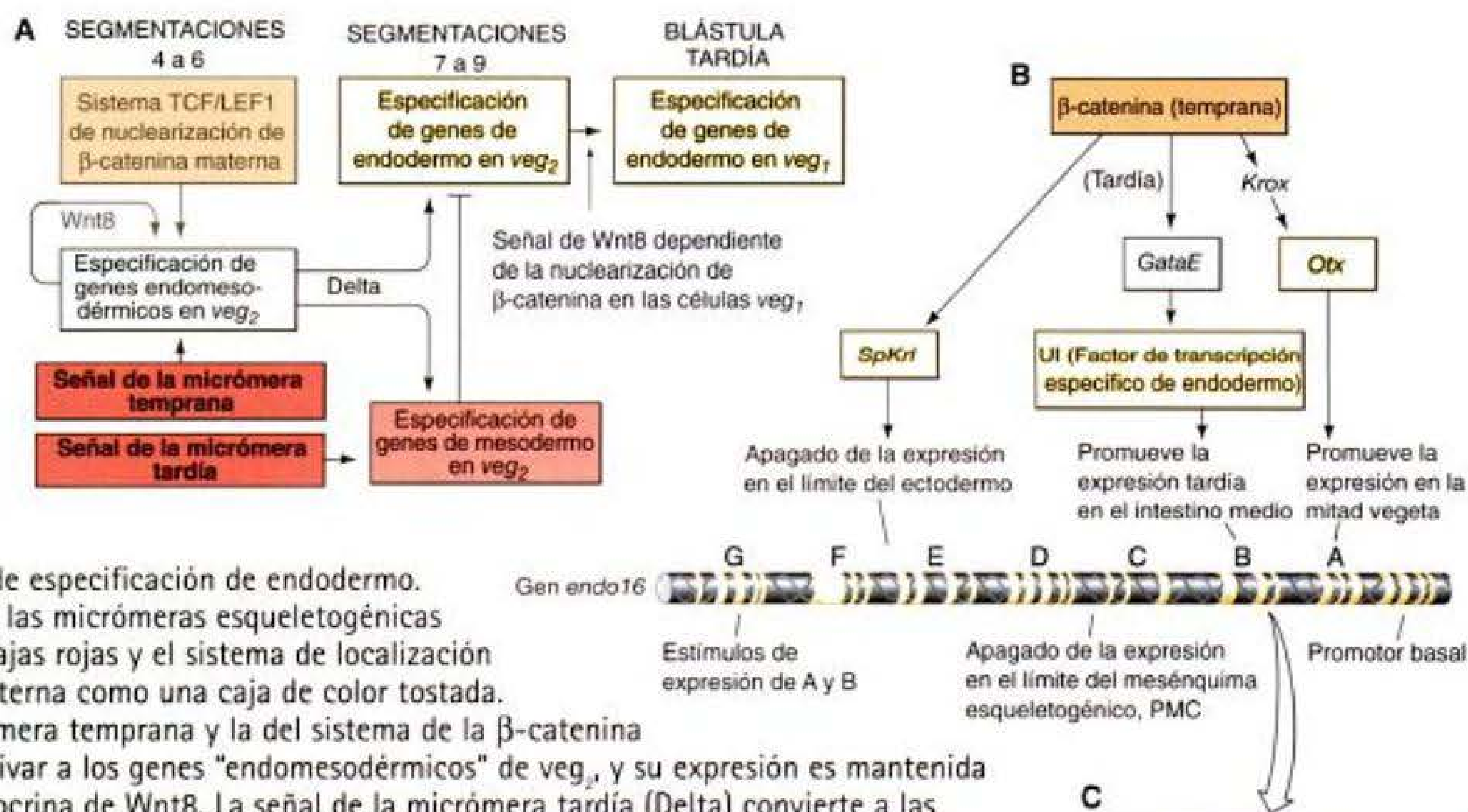


Fig. 8-14. Modelo de especificación de endodermo. **A.** Las señales desde las micrómeras esqueletogénicas se muestran como cajas rojas y el sistema de localización de la β-catenina materna como una caja de color tostada. La señal de la micrómera temprana y la del sistema de la β-catenina interactúan para activar a los genes "endomesodérmicos" de veg_2, y su expresión es mantenida por la expresión autocrina de Wnt8. La señal de la micrómera tardía (Delta) convierte a las células veg_2 más vegetales en mesénquima secundario, mientras que las células que no reciben la señal llegan a ser veg_2 endodermo. La señal de Wnt8 también puede provocar la localización nuclear de la β-catenina en las células veg_1 en la blástula tardía, convirtiéndolas en endodermo. Esta señal también bloquea la activación de genes específicos de ectodermo en las células veg_1. El mesodermo secundario de veg_2 es de algún modo capaz de impedir a las células endodérmicas de veg_2 que lleguen a ser mesodermo secundario. Se sabe esto debido a que la eliminación de las células del mesodermo secundario da como resultado la transformación del endodermo de veg_2 en mesodermo secundario. **B.** Activación de un gen específico de endodermo mediante factores de transcripción específicos. Durante los estadios de blástula, el complejo de β-catenina activa a Otx. Más tarde, β-catenina activa a los genes *GataE* y *SpKrl*. El gen *endo16* es utilizado como un ejemplo de un gen específico de endodermo. Éste tiene siete módulos regulatorios. El módulo A promueve su expresión en la región vegetal de la blástula, y es regulado positivamente por Otx. El módulo B potencia la transcripción en el intestino medio durante y después de la gastrulación; éste es positivamente regulado por UI. Los módulos E y F controlan la expresión de *endo16* en la unión ectodermo-mesodermo, y éste es presumiblemente regulado a través de SpKrl. **C.** El producto del gen *endo16* (tinción azul oscura), su transcripción promovida por el módulo B e inhibida por los módulos C-F, es hallado solo en las células del endodermo del intestino medio. (**A**, según Davidson y col. 2002; **B**, según Yuh y col. 2001; **C** de Oliveri 2002, fotografía cortesía de E. Davidson.)

porción de la red regulatoria que activa al gen *endo 16*. La región regulatoria corriente arriba de *endo 16* contiene siete elementos modulares con al menos trece factores de transcripción diferentes unidos. Algunas de estas regiones modulares activan la transcripción de *endo* 16, mientras que otros módulos actúan inhibiendo la transcripción de *endo 16*. En la figura 8-14B, los módulos 1 y 2 activan la expresión de *endo 16* en las células vegetales (previamente a la gastrulación) y en el intestino medio (durante y después de la gastrulación). Los módulos inhibitorios son activados en aquellas otras células que no serán endodermo. Por lo tanto, las diferentes regiones de la región regulatoria de *endo 16* actúan sinérgicamente para asegurar que el gen *endo 16* es expresado solamente en el endodermo del intestino medio (fig. 8-14C) y no en otros tipos celulares (Yuh y col. 2001; Davidson y col. 2002).

ESPECIFICACIÓN DE EJES. En la blástula del erizo de mar, los destinos celulares se alinean a lo largo del eje animal-vegetal establecido en el citoplasma del óvulo antes de la fecundación. El eje animal-vegetal también parece estructurar el futuro eje anteroposterior, con la región vegetal secuestrando aquellos componentes maternos necesarios para el desarrollo posterior (Boveri 1901; Maruyama y col. 1985).

En la mayoría de los erizos de mar, los ejes dorsoventral e izquierda-derecha son especificados después de la fecundación, pero el modo de su especificación no es bien entendido. El eje oral-aboral (ventral-dorsal) de los embriones de erizo de mar en general es definido por el primer plano de segmentación. La inyección de marcadores trazadores de linaje en una blastómera en el estadio de dos células demostró que en casi todos los casos, el polo oral del futuro eje oral-aboral se instala a 45 grados en sentido horario desde el primer plano de segmentación visto del polo animal (Cameron y col. 1989). Curiosamente, en los erizos de mar que evitan entrar en el estadio larval para desarrollarse directamente a juveniles, el eje dorsoventral es especificado maternamente en el citoplasma del óvulo (Henry y Raff 1990).

SITIO WEB 8.2 **Especificación celular del erizo de mar (Sea urchin cell specification).** La especificación de las células del erizo de mar fue uno de los primeros proyectos principales de investigación en embriología experimental y continúa siendo una de las áreas fascinantes de la investigación. Parece que la señalización inicial analiza a la blástula en dominios caracterizados por la expresión de factores de transcripción específicos.

Gastrulación en el erizo de mar

La blástula tardía del erizo de mar consiste en una única capa de cerca de 1000 células que forman una esfera hueca, algo aplanada en su extremo vegetal. Las blastómeras, derivadas de diferentes regiones del cigoto, tienen distintos tamaños y propiedades. Las figuras 8-15 y 8-16 muestran los destinos de varias regiones de la blástula cuando ésta se desarrolla durante la gastrulación al estado de **larva plútea** característico de los erizos de mar. El destino de cada capa celular puede ser visto a través de sus movimientos durante la gastrulación.

Ingresión del mesénquima primario

FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS PRIMARIAS. Poco tiempo después de la eclosión de la blástula de su membrana de fecundación, el lado vegetal de la blástula esférica comienza a engrosarse y se aplana (fig. 8-16, 9 horas). En el centro de esta placa vegetal plana, un grupo de células pequeñas comienza a cambiar. Estas células comienzan a contraer y extender desde su superficie interna largas y finas prolongaciones (30×5 μm) denominadas **filopodios**. Luego se disocian de la monocapa epitelial y llevan a cabo la ingresión en el blastocele (fig. 8-16, 9-10 horas). Estas células, derivadas de las micrómeras y denominadas el **mesénquima primario** formarán el esqueleto larval, de modo tal que a veces son denominadas el **mesénquima esqueletogénico**. Al principio las células parecen moverse azarosamente a lo largo de la superficie interna del blastocele, formando y deshaciendo activamente conexiones filopodiales con la pared del blastocele. Finalmente, sin embargo, llegan a estar localizadas dentro de la región ventrolate-

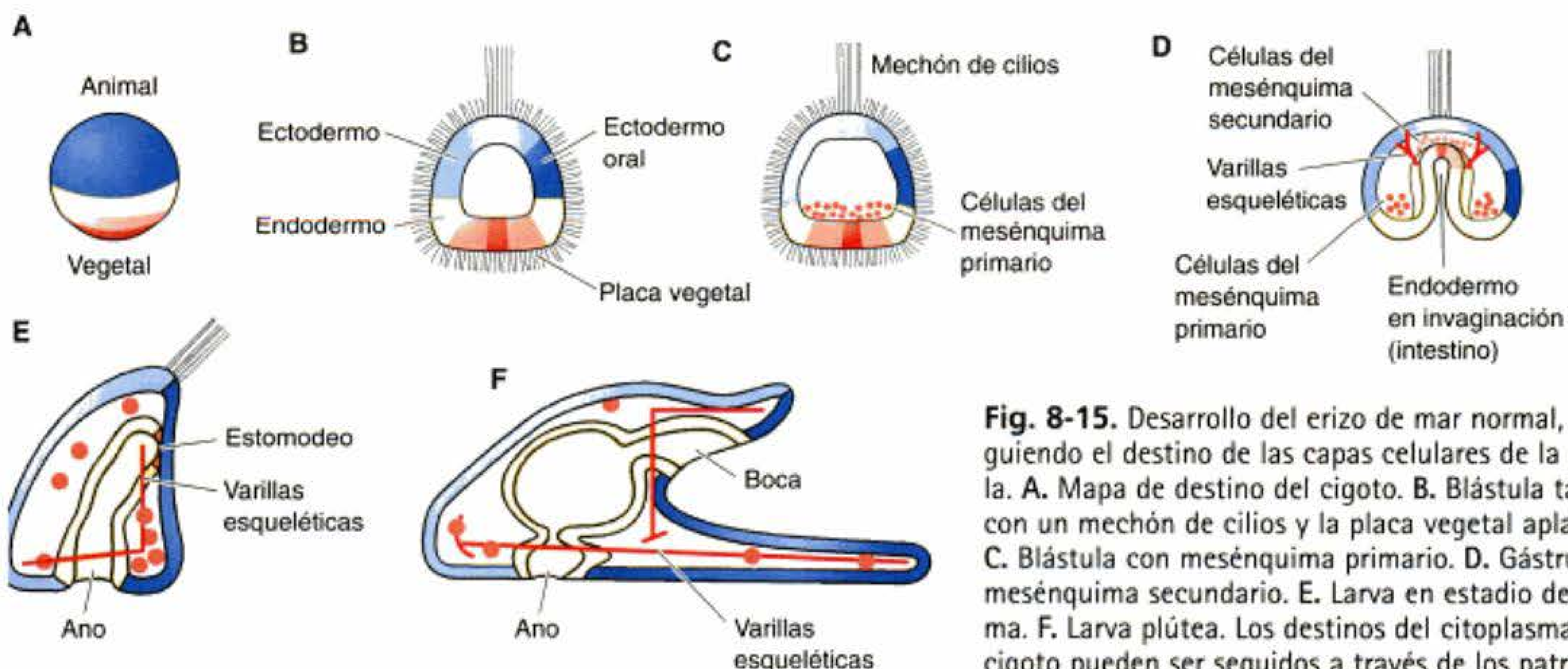


Fig. 8-15. Desarrollo del erizo de mar normal, siguiendo el destino de las capas celulares de la blástula. **A.** Mapa de destino del cigoto. **B.** Blástula tardía con un mechón de cilios y la placa vegetal aplanada. **C.** Blástula con mesénquima primario. **D.** Gástrula con mesénquima secundario. **E.** Larva en estadio de prisma. **F.** Larva plútea. Los destinos del citoplasma del cigoto pueden ser seguidos a través de los patrones de color (véase fig. 8-11). (Cortesía de D. McClay.)



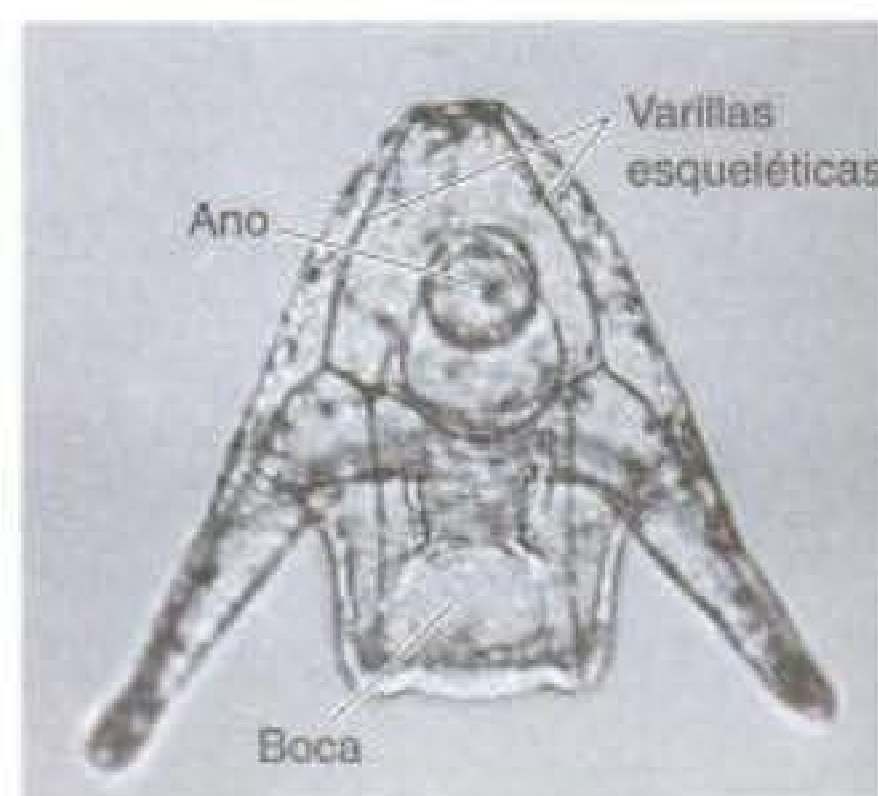


Fig. 8-16. Secuencia completa de la gastrulación en *Lytechinus variegatus.* El tiempo muestra la duración del desarrollo a 25°C. (Microfotografías cortesía de J. Morrill; larva plútea cortesía de G. Watchmaker.)

ral prospectiva del blastocele, donde se fusionan en cables sincitiales, que formarán el eje de las espículas de carbonato de calcio del esqueleto larval (fig. 8-17).

IMPORTANCIA DE LA LÁMINA EXTRACELULAR DENTRO DEL BLASTOCELE. La ingresión de las micrómeras que descienden hacia el blastocele es el resultado de que estas células pierdan su afinidad por sus vecinas y por la membrana hialina; en su lugar adquieren una fuerte afinidad por un grupo de proteínas que revisten el blastocele. Este modelo fue propuesto primero por Gustafson y Wolpert (1967) y fue confirmado en 1985, cuando Rachel Fink y David McClay midieron las fuerzas de adhesión de las blastómeras del erizo de mar a la capa hialina, a la lámina basal que reviste al blastocele y a otras blastómeras.

Originalmente, todas las células de la blástula están conectadas sobre su superficie externa a la membrana hialina y sobre su superficie interna a la lámina basal secretada por las células. Sobre sus superficies laterales, cada célula tiene a otra célula como vecina. Fink y McClay hallaron que las células del ectodermo y del endodermo prospectivo (descendientes de las mesómeras y macrómeras, respectivamente) se unen estrechamente entre sí y a la capa hialina, pero solo se adhieren laxamente a la lámina basal (cuadro 8-2). Las micrómeras originalmente exhiben un patrón de unión similar. Sin embargo, el patrón de las micrómeras cambia en la gastrulación. Mientras que las otras células retienen su unión estrecha a la capa hialina y a las células vecinas, los precursores del mesénquima primario pierden su afinidad por estas estructuras (que descienden cerca de un 2% de su valor original), mientras que su afinidad por los componentes de la lámina basal y de la matriz extracelular (como fibronectina) aumenta un céntuplo. Este cambio en la afinidad hace que las micrómeras liberen sus adhesiones a la capa hialina externa y a sus células vecinas y se retraigan por la lámina basal, para migrar hacia el blastocele (figs. 8-17 y 8-18). Estos cambios en la afinidad han sido correlacionados con cambios en las moléculas de superficie celular que se producen durante esta etapa (Wessel y McClay 1985). Se ha demostrado que proteínas tales como fibronectina, integrina, laminina, L1 y caderinas están involucradas en la ingresión celular.

Como se muestra en la figura 8-17, hay una alta concentración de material extracelular alrededor de las células del mesénquima primario en ingresión (Galileo y Morrill 1985; Cherr y col. 1992). Una vez dentro del blastocele, las células del mesénquima primario parecen migrar

Cuadro 8-2 *Afinidades de las células mesenquimáticas y no mesenquimáticas a los componentes celulares y extracelulares*[a]

	Fuerza de disociación (en dinas)		
Tipo celular	*Hialina*	*Monocapas celulares de la gástrula*	*Lámina basal*
Micrómeras del estadio de 16 células	$5{,}8 \times 10^{-5}$	$6{,}8 \times 10^{-5}$	$4{,}8 \times 10^{-7}$
Células mesenquimáticas del estadio migratorio	$1{,}2 \times 10^{-7}$	$1{,}2 \times 10^{-7}$	$1{,}5 \times 10^{-5}$
Endodermo y ectodermo de la gástrula	$5{,}0 \times 10^{-5}$	$5{,}0 \times 10^{-5}$	$5{,}0 \times 10^{-7}$

Fuente: Según Fink y McClay 1985.

[a] A las células analizadas se les permitió adherirse a placas que contenían hialina, lámina basal extracelular o monocapas celulares. Las placas fueron invertidas y centrifugadas a varias fuerzas para disociar a las células. La fuerza de disociación se calcula a partir de la fuerza centrífuga necesaria para eliminar del sustrato a las células analizadas.

a lo largo de la matriz extracelular de la pared del blastocele, extendiendo sus filopodios frente a ellas (Galileo y Morrill 1985; Karp y Solursh 1985). Varias proteínas (incluida fibronectina y una glucoproteína sulfatada particular) son necesarias para iniciar y mantener esta migración (Wessel y col. 1984; Sugiyama 1972; Lane y Solursh 1991; Berg y col. 1996).

Pero estas señales guías no son suficientes debido a que las células migrantes "conocen" cuándo detener sus movimientos y cuándo formar espículas cerca del ecuador del blastocele. Las células del mesénquima primario se disponen en un anillo en una posición específica a lo largo del eje animal-vegetal. En dos sitios cerca del futuro lado ventral de la larva, muchas de estas células del mesénquima primario se agrupan, fusionándose entre sí, e iniciando la formación de espículas (fig. 8-17A; Hodor y Ettensohn 1998). Si una micrómera marcada desde otro embrión es inyectada en el blastocele de un embrión de erizo de mar gastrulando, ésta migra hasta la localización correcta y contribuye a la formación de las espículas embrionarias (fig. 8-19; Ettensohn 1990). Se piensa que la información posicional necesaria es proporcionada por las células del ectodermo prospectivo y su lámina basal (Harkey y Whiteley 1980; Armstrong y col. 1993; Malinda y Ettensohn 1994). Solo las células del mesénquima primario (y no otros tipos celulares o bolitas de látex) son capaces de responder a estas señales formadoras de patrón (Ettensohn y McClay 1986). Miller y col. (1995) informaron la existencia de filopodios extremadamente finos (0,3 μm de diámetro) sobre las células del mesénquima formador de citoesqueleto. No creen que estos filopodios funcionen en la locomoción; en su lugar, parecen explorar y detectar en la pared del blastocele y podrían ser responsables de recoger señales del establecimiento del patrón dorsoventral y animal-vegetal desde el ectodermo (fig. 8-19; Malinda y col. 1995).

Primer estadio de la invaginación del arquenterón

A medida que las células del mesénquima primario dejan la región vegetal del blastocele, ocurren importantes cambios en las células que se mantienen en la placa vegetal. Estas células se mantienen unidas entre sí y a la capa hialina del huevo (es un huevo de erizo de mar gastrulando) y se mueven llenando los espacios causados por la ingresión del mesénquima primario. Además, la placa vegetal se incurva hacia adentro y se invagina cerca de una cuarta parte hasta la mitad del camino hacia el interior del blastocele (fig. 8-20A; véase también fig. 8-16, 10.5 a 11.5 horas). A continuación la invaginación cesa bruscamente. La región invaginada es denominada el **arquenterón** (intestino primitivo) y la apertura del arquenterón en el polo vegetal se denomina el **blastoporo.**

La invaginación parece ser causada por cambios en la forma en las células de la placa vegetal y en la matriz extracelular subyacente a ellas. Kimberly y Hardin (1998) han demostrado que un grupo de células de la placa vegetal rodeando las 2-8 células del polo vegetal adoptan la forma de botella, estrechando sus extremos apicales. Estos cambios llevan a las células a arrugarse hacia adentro. La destrucción de estas células con láser retarda la gastrulación. Además, la capa hialina en la placa vegetal se incurva hacia adentro debido a cambios en su composición (Lane y col. 1993). La capa hialina está en realidad constituida por dos capas, una lámina externa hecha primariamente de proteína hialina y una lámina interna compuesta de proteínas de fibropelina (*fibropellin*) (Hall y Vacquier 1982; Bisgrove y col. 1991). Las fibropelinas son almacenadas en gránulos secretorios dentro del ovocito y son secretadas desde aquellos gránulos después que la exocitosis de los gránulos corticales libera la proteína hialina. Alrededor del estadio de blástula, las fibropelinas han formado una red tipo malla sobre la superficie del embrión. En el momento de la invaginación, las células de la placa vegetal (y solo aquellas células) secretan el proteoglucano condroitín sulfato dentro de la lámina interna de la capa hialina directamente por debajo de ellas. Esta molécula higroscópica (absorbedora de agua) hincha la lámina interna, pero no la lámina externa, que hace que la región vegetal de la capa hialina se incurve (fig. 8-20B,C). Un poco más tarde, una segunda fuerza originada desde los movimientos de las células epiteliales adyacentes a la placa vegetal puede facilitar la invaginación al empujar la capa curvada hacia adentro (Burke y col. 1991).

En el estadio en el cual las células mesenquimáticas esqueletogénicas comienzan la ingresión en el blastocele, los destinos de las células de la placa vegetal ya han sido especificados (fig. 8-21; Ruffins y Ettensohn 1996). Las células endodérmicas adyacentes al mesénquima derivado de las micrómeras llegan a ser intestino anterior, migrando las distancias más largas en el blastocele. La siguiente capa de células endodérmicas llega a ser intes-

Fig. 8-17. Formación de cables sincitiales por las células del mesénquima primario del erizo de mar. **A.** Las células del mesénquima primario en la gástrula temprana se alinean y fusionan para establecer la matriz de las espículas de carbonato de calcio (*flechas*). **B.** Microfotografía electrónica de barrido (SEM) de espículas formadas por la fusión de las células del mesénquima primario en cables sincitiales. **C.** SEM de células del mesénquima primario enredadas en la matriz extracelular de la gástrula temprana de *Strongylocentrotus*. **D.** Migración de las células del mesénquima del estadio de gástrula. Las fibrillas de la matriz extracelular del blastocele se extienden paralelas al eje animal-vegetal y están íntimamente asociadas con las células del mesénquima primario. (**A**, de Ettensohn 1990; **B**, de Morrill y Santos 1985; **C**, **D**, de Cherr y col. 1992; todas las fotografías son cortesía de los autores.)

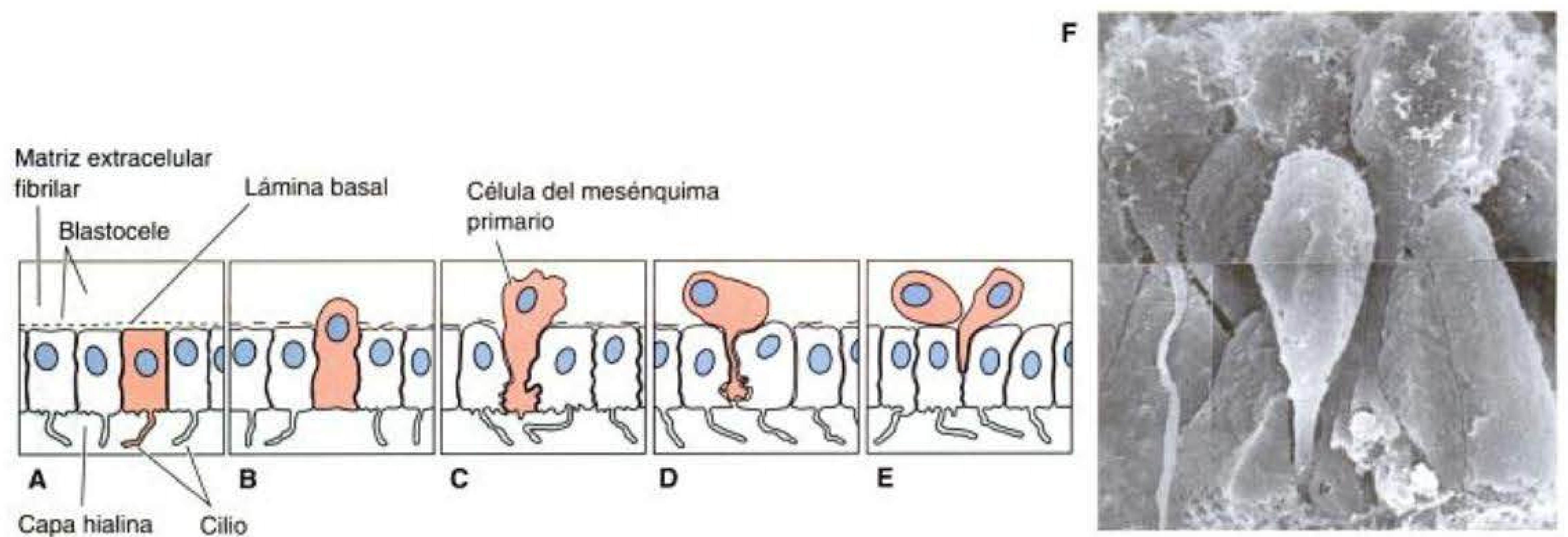


Fig. 8-18. Ingresión de las células del mesénquima primario. **A-E.** Diagrama interpretativo que representa los cambios en las afinidades adhesivas de las células mesenquimáticas primarias presuntivas (rosa). Estas células pierden sus afinidades por hialina y por sus blastómeras vecinas mientras que aumentan su afinidad por las proteínas de la lámina basal. Las blastómeras no mesenquimáticas retienen su alta afinidad original por la capa hialina y por las células vecinas. **F.** Montaje de SEM que muestra la ingresión de las células del mesénquima primario en *Lytechinus variegatus*. (**F**, cortesía de J. B. Morrill y D. Flaherty.)

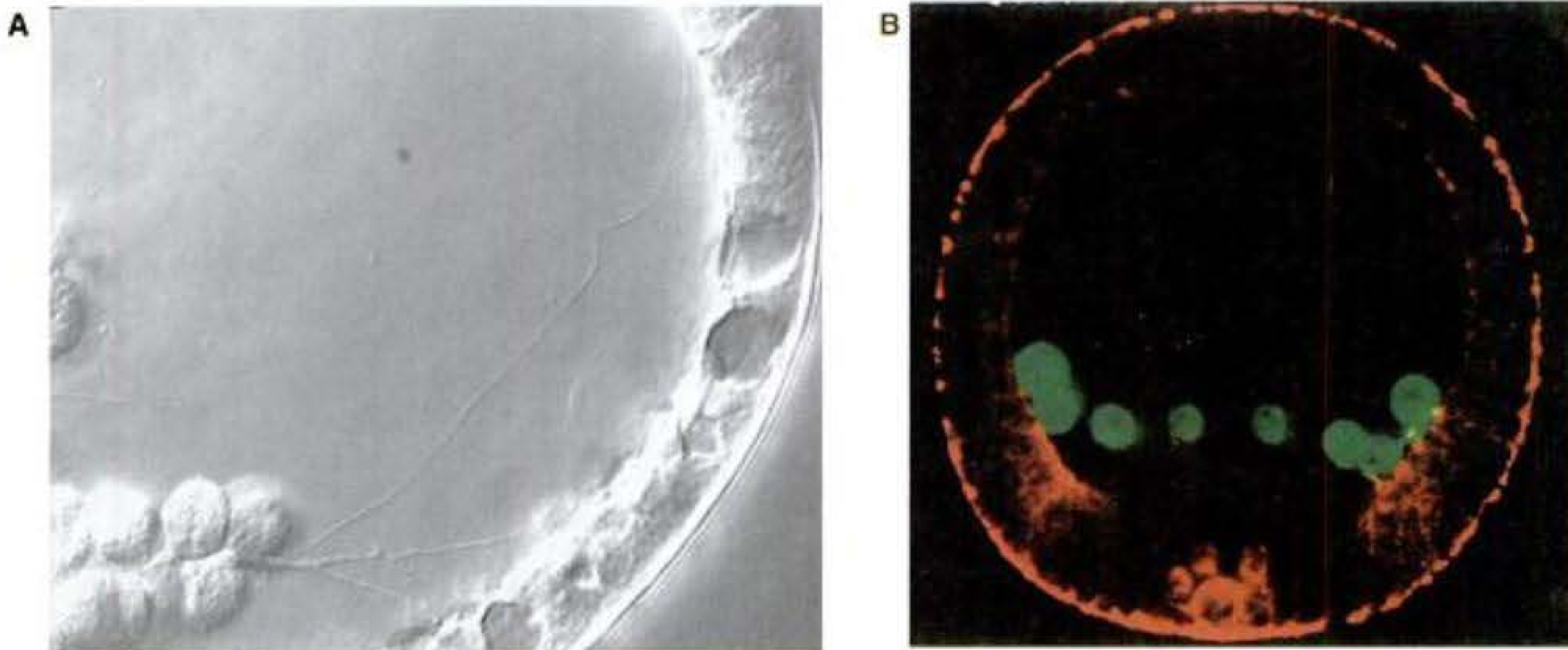


Fig. 8-19. Localización de las células del mesénquima primario. **A.** Videomicrografía de Nomarski que muestra filopodios largos y finos extendiéndose desde una célula del mesénquima primario a la pared ectodérmica de la gástrula, así como unos filopodios más cortos extendiéndose hacia el interior del ectodermo. Los filopodios mesenquimáticos se extienden a través de la matriz extracelular y contactan directamente la membrana celular de las células ectodérmicas. **B.** La localización de las micrómeras para formar el esqueleto de bicarbonato de calcio es determinada por las células ectodérmicas. Las células del mesénquima primario están teñidas de verde, mientras que la β-catenina está teñida de rojo. Las células del mesénquima primario parecen acumularse en aquellas regiones caracterizadas por altas concentraciones de β-catenina. (A, de Miller y col. 1995; microfotografías cortesía de J. R. Miller y D. McClay.)

tino medio, y la última fila circunferencial se invagina para formar el intestino posterior y el ano.

Segundo y tercer estadios de la invaginación del arquenterón

La invaginación de las células vegetales se produce en etapas distintas. Después de una breve pausa que sigue a la invaginación inicial, comienza la segunda fase de la formación del arquenterón. Durante esta etapa, el arquenterón se extiende exageradamente, a veces triplicando su longitud. En este proceso de extensión, el rudimento ancho y corto de intestino es transformado en un tubo delgado y fino (fig. 8-22; véase además fig. 8-16, 12 horas). Para llevar a cabo esta extensión, las células del arquenterón se reorganizan al migrar una sobre la otra y al autoaplanarse (Ettensohn 1985; Hardin y Cheng 1986). Este fenómeno, por el cual las células se intercalan para

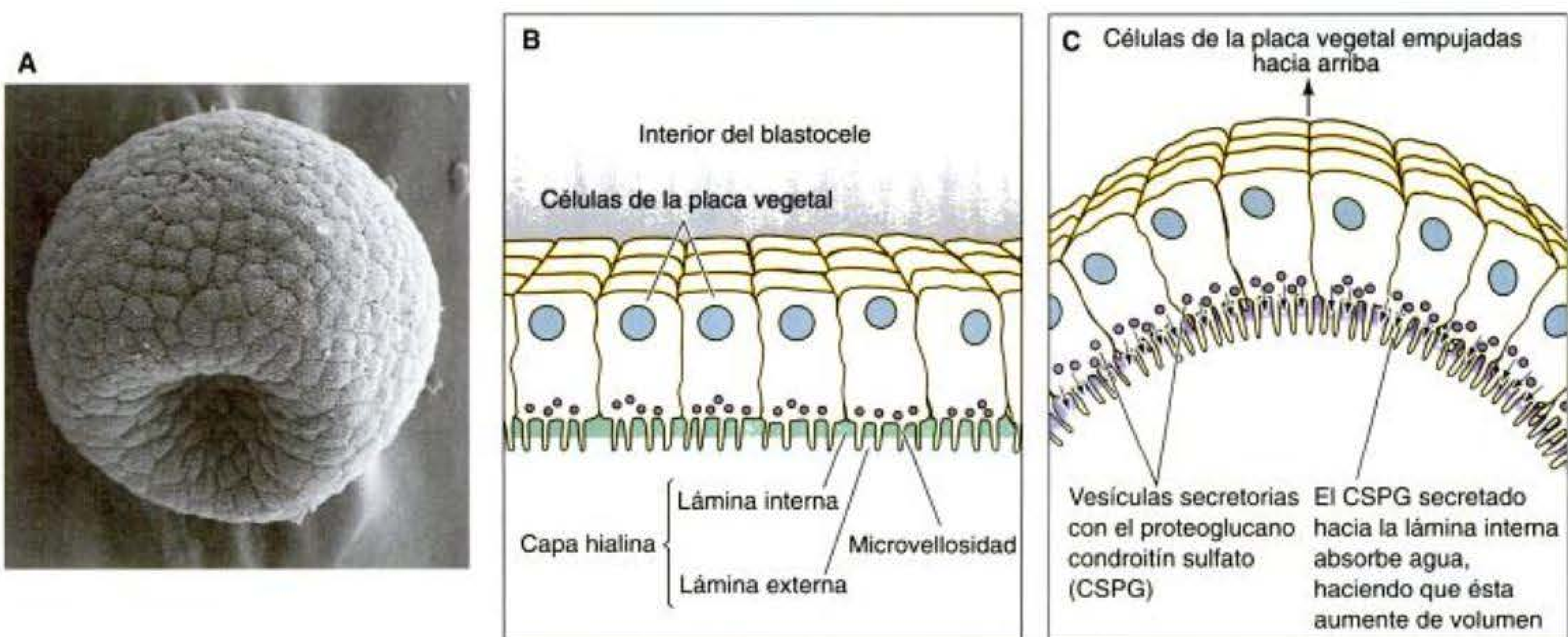


Fig. 8-20. Invaginación de la placa vegetal. **A.** Invaginación de la placa vegetal en *Lytechinus variegatus*, vista mediante microscopía electrónica de la superficie externa de la gástrula temprana. El blastoporo es claramente visible. **B.** La capa hialina consiste en una lámina interna y una externa. Las microvellosidades desde la placa vegetal se extienden a través de la capa hialina y sus citoplasmas contienen vesículas secretorias que almacenan al proteoglucano condroitín sulfato (CSPG). **C.** Los gránulos almacenados secretan CSPG en la lámina interna de la capa hialina. El CSPG absorbe agua y aumenta el volumen de la lámina interna, mientras que la lámina externa, a la que éste no se adhiere, no aumenta de volumen. Esto hace que la capa hialina y su epitelio adherido se incurven hacia adentro. (A, de Morrill y Santos 1985, cortesía de J. B. Morrill; B y C, según Lane y col. 1993.)

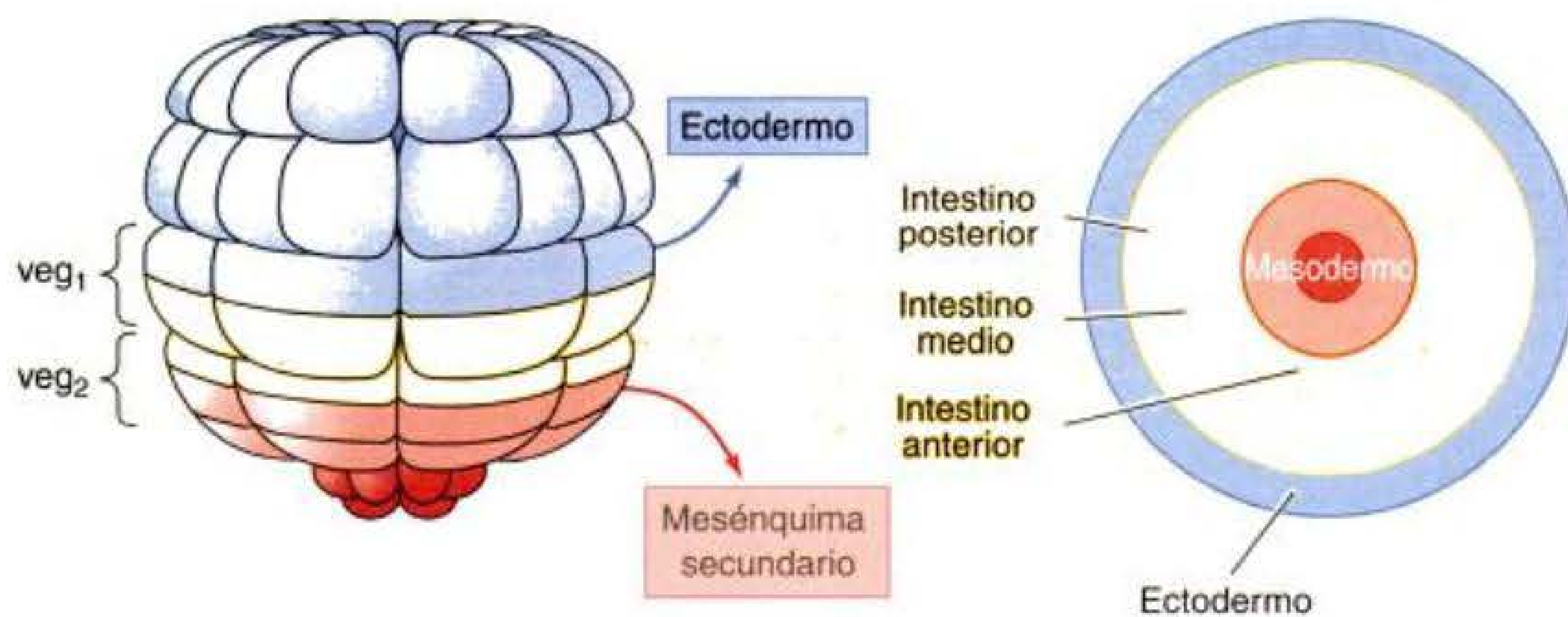


Fig. 8-21. Mapa de destino de la placa vegetal de los embriones de erizo de mar, mirando hacia "arriba" en la superficie vegetal. La porción central se convierte en las células del meséquima secundario, mientras que las capas concéntricas alrededor de ésta se convierten en el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior respectivamente. El límite donde el endodermo se encuentra con el ectodermo marca el ano. El mesénquima secundario y el intestino anterior vienen de la capa veg$_2$, el intestino medio viene de las células veg$_1$ y veg$_2$ y el intestino posterior (y el ectodermo en contacto con éste) viene de la capa de veg$_1$. (Según Logan y McClay 1999.)

estrechar el tejido y al mismo tiempo se mueven hacia adelante, es denominado **extensión convergente**. Además, continúa la división celular, produciendo más células endodérmicas y del mesénquima secundario a medida que se extiende el arquenterón (fig. 8-23; Martins y col. 1998).

En algunas especies de erizos de mar, se produce un tercer estadio de elongación del arquenterón. Esta fase final es iniciada por la tensión proporcionada por las células del mesénquima secundario, que se forman en el extremo del arquenterón y se mantienen allí (fig. 8-24; véase también fig. 8-16, 12 horas). Estas células extienden filopodios a través del líquido del blastocele para contactar la superficie interna de la pared del blastocele (Dan y Okazaki 1956; Schroeder 1981). El filopodio se adhiere a la pared en las uniones entre las blastómeras y luego se acorta, tirando del arquenterón (véase fig. 8-16, 13 horas). Hardin (1988) extirpó las células del mesénquima secundario con láser, con el resultado de que el arquenterón pudo alargarse solo dos tercios de la longitud normal. Si se dejaban algunas células del mesénquima secundario, continuaba alargándose, aunque a una velocidad menor. Las células del mesénquima secundario, en esta especie, desempeñan un papel esencial en tirar del arquenterón hacia la pared del blastocele durante la última fase de la invaginación.

Pero, ¿pueden los filopodios del mesénquima secundario engancharse a cualquier parte de la pared del blastocele, o hay un blanco de interés específico en el hemisferio animal que debe estar presente para que se produzca la adherencia? ¿Hay una región de la pared del blastocele que esta realmente comprometida para llegar a ser el lado ventral de la larva? Los estudios por Hardin y McClay (1990) mostraron que hay un sitio "de interés" específico para los filopodios que difiere del de otras regiones del hemisferio animal. Los filopodios se extienden, tocan la pared del blastocele en sitios azarosos y luego se retraen. Sin embargo, cuando los filopodios contactan con una región particular de la pared, se mantienen anclados allí, aplanándose hacia afuera contra esta región y tiran del arquenterón hacia ésta. Cuando Hardin y McClay empujaron la pared del blastocele por el otro lado de modo que los contactos se hicieran más fácilmente con esta región, los filopodios continuaron extendiéndose y retrayéndose después de tocarla. Solo cuando los filopodios encontraban su sitio "de interés" cesaban sus movimientos. Si la gástrula era estrechada de modo tal que los filopodios nunca alcanzaran el área de interés, las

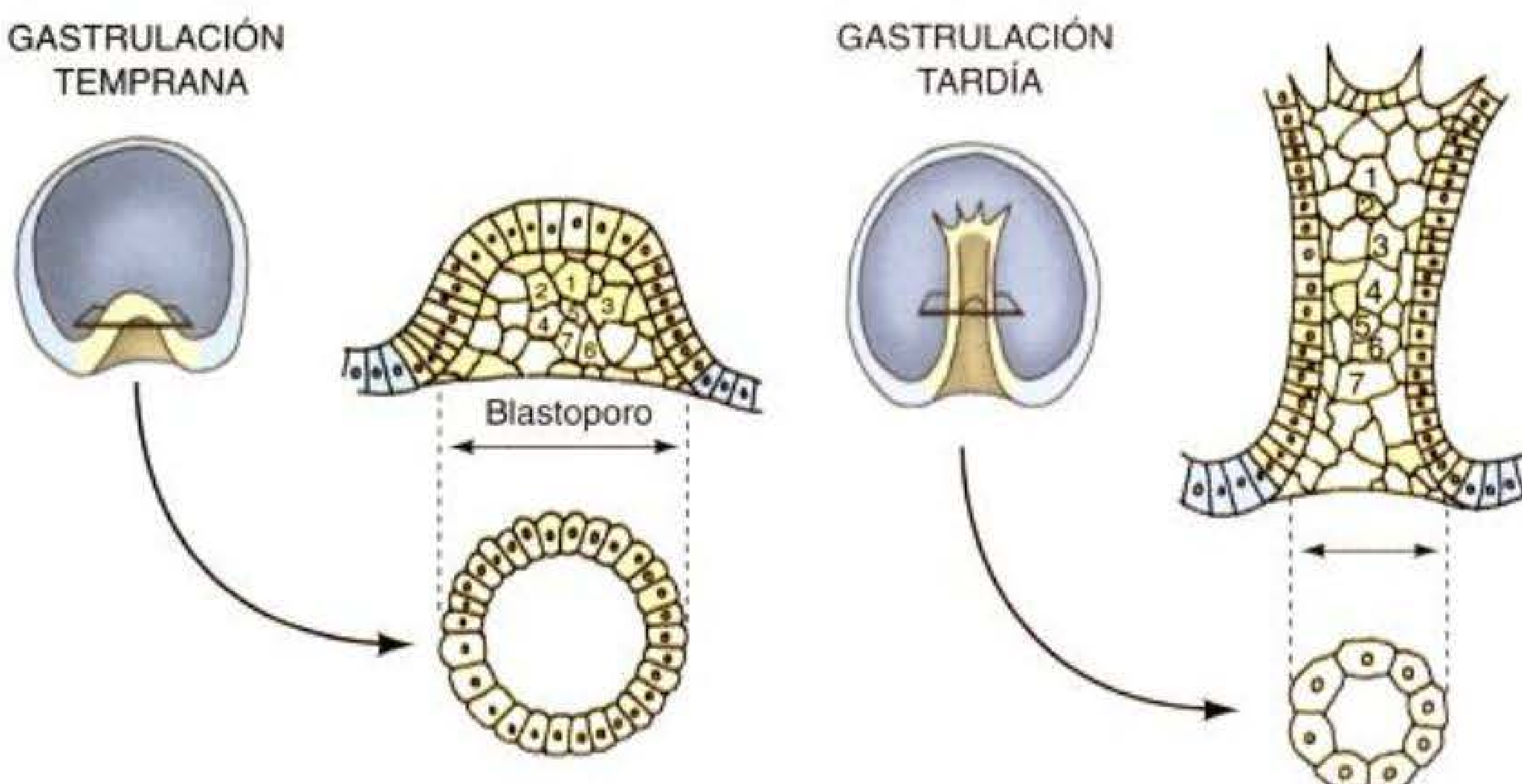


Fig. 8-22. Reorganización celular durante la extensión del arquenterón en los embriones de erizo de mar. En estas especies, el arquenterón temprano tiene 20 a 30 células alrededor de su circunferencia. Más tarde en la gastrulación, el arquenterón tiene una circunferencia hecha solo por 6 a 8 células. Clones marcados fluorescentemente pueden ser vistos extenderse apicalmente. (Según Hardin 1990.)

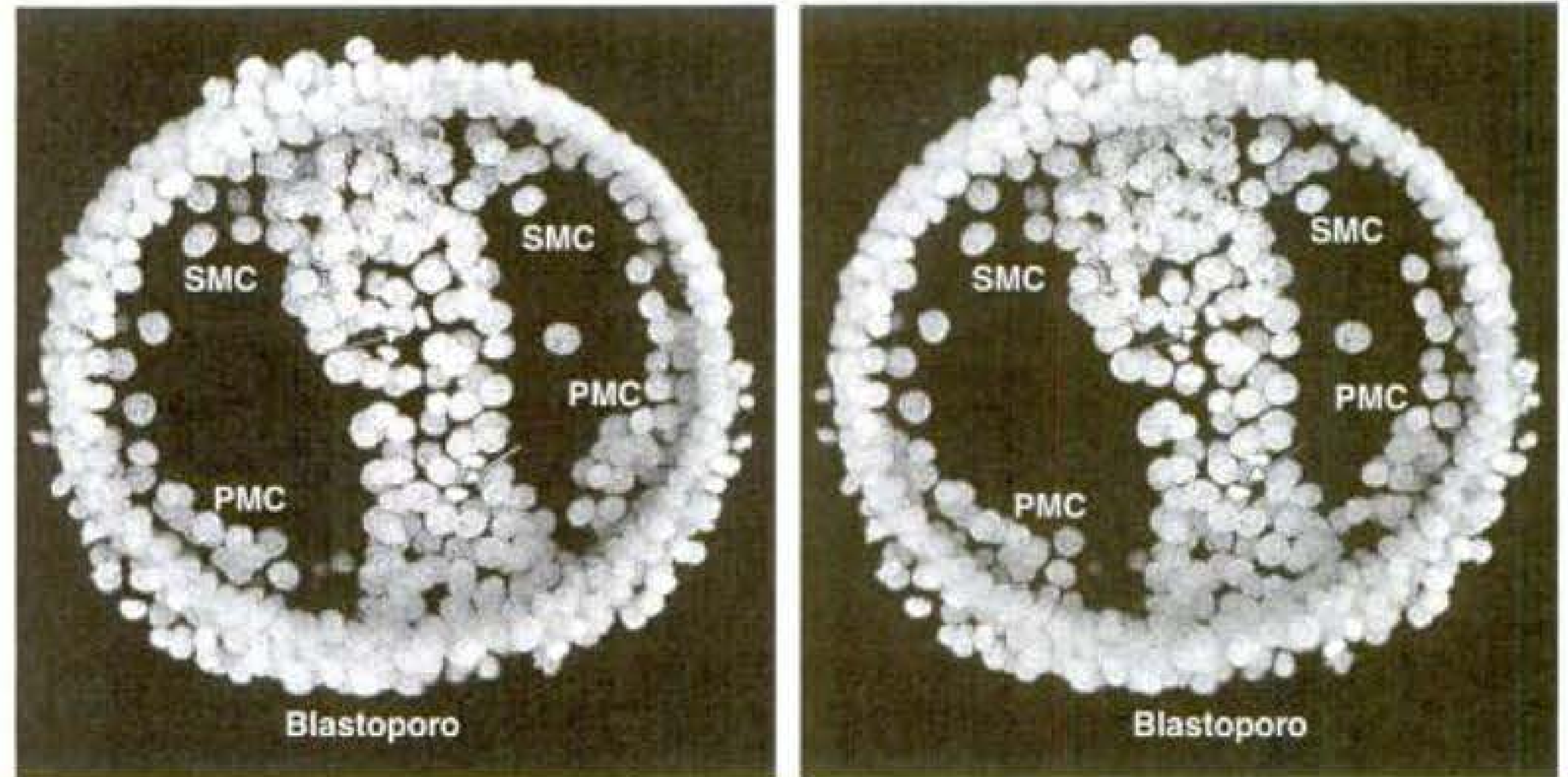


Fig. 8-23. Par estéreo que muestra una gástrula de *Lytechinus* durante la dispersión de las células del mesénquima secundario. Se ha producido la extensión convergente y pueden verse unas pocas figuras mitóticas (flechas pequeñas). (PMC, célula del mesénquima primario; SMC célula del mesénquima secundario.) Si cruza sus ojos, se formará una "imagen central" tridimensional. (De Martins y col. 1998; microfotografías cortesía de los autores.)

células del mesénquima secundario continuaban explorando hasta que finalmente se separaban del arquenterón y encontraban los tejidos de interés como células migrantes libres. Parece, entonces, que hay una región de interés, la que llega a ser el lado ventral de la larva que es reconocida por las células del mesénquima secundario y que posiciona al arquenterón en la región donde se formará la boca.

A medida que el extremo del arquenterón se encuentra con la pared del blastocele en la región de interés, las células del mesénquima secundario se dispersan en el blastocele, donde proliferan para formar los órganos mesodérmicos (véase fig. 8-16, 13.5 horas). Donde el arquenterón contacta con la pared, se forma finalmente la boca. Ésta se fusiona con el arquenterón para crear un tubo digestivo continuo. Por lo tanto, como es característica de los deuterostomas, el blastoporo marca la posición del ano.

VADE MECUM². **Desarrollo del erizo de mar (Sea urchin development).** El CD-ROM proporciona un excelente repaso del desarrollo del erizo de mar como también sobre preguntas fundamentales de la segmentación y gastrulación de los equinodermos. **[Hacer clic sobre Sea Urchin]**

DESARROLLO TEMPRANO DE LOS CARACOLES

Segmentación en los embriones de caracol

La **segmentación holoblástica espiral** es característica de varios grupos de animales, incluidos gusanos anélidos, algunos gusanos planos y la mayoría de los moluscos. Esta difiere de la segmentación radial en numerosos sentidos. En primer lugar, el plano de segmentación no es paralelo o perpendicular al eje animal-vegetal del cigoto; en su lugar, la segmentación es en ángulo oblicuo, formando una disposición en "espiral" de las blastómeras hijas. En segundo lugar, las células se tocan entre sí en más lugares que las de los embriones que se segmentan radialmente. En efecto, adoptan la orientación de empaquetamiento termodinámicamente más estable, como el de las burbujas adyacentes del jabón. En tercer lugar, los embriones que se segmentan espiralmente con frecuencia experimentan pocas divisiones antes de comenzar la gastrulación, haciendo esto posible seguir el destino de cada

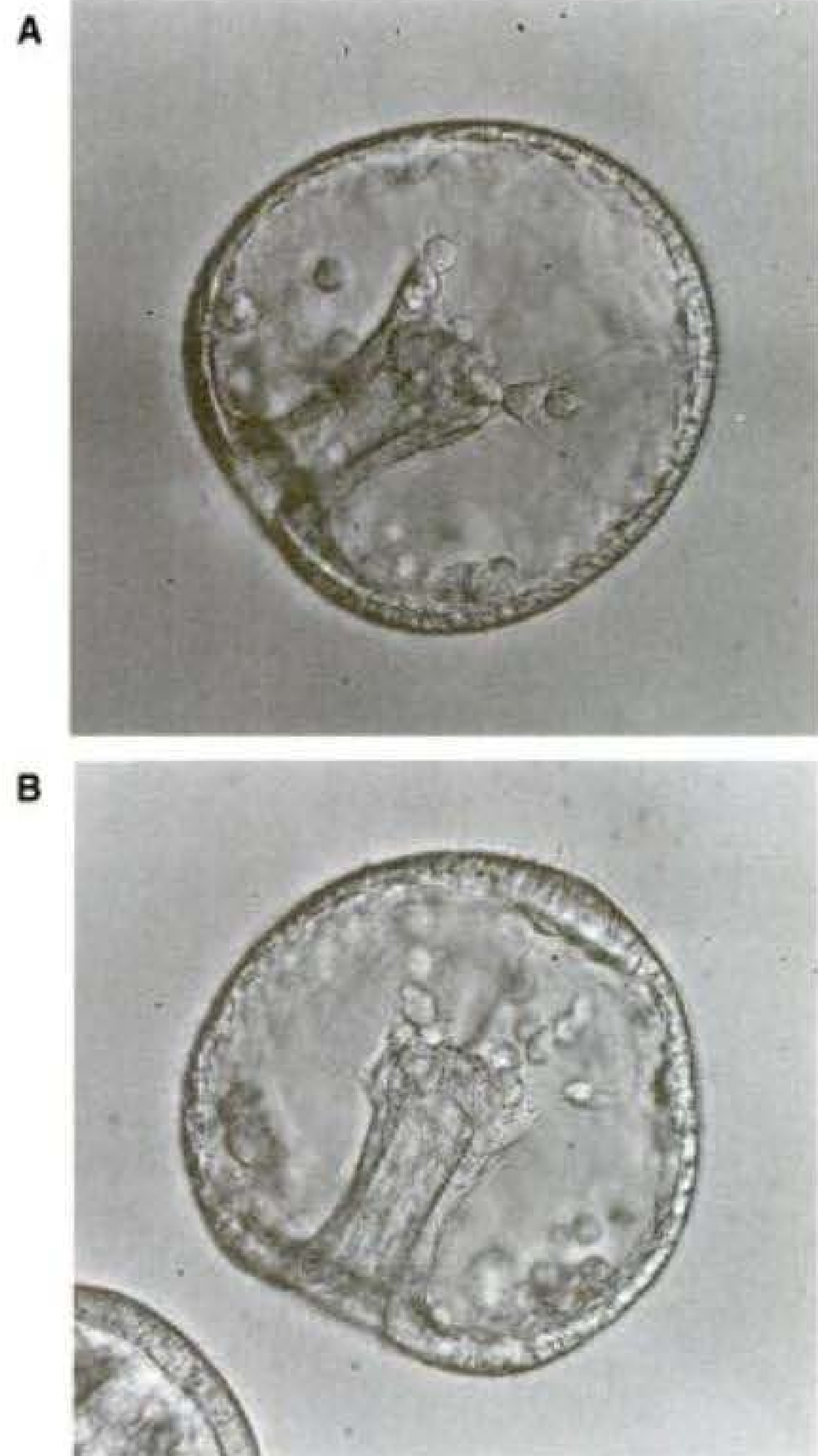
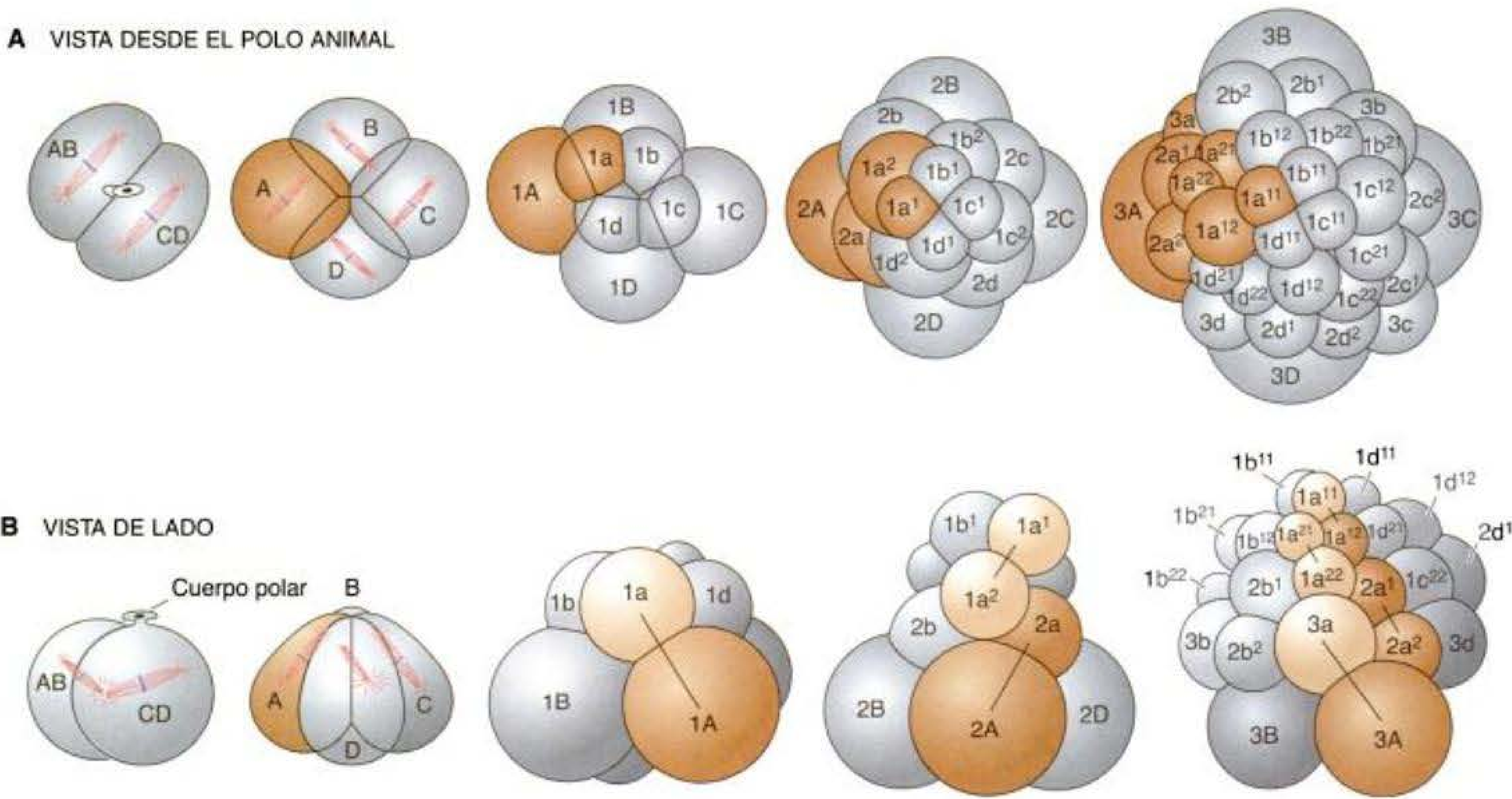


Fig. 8-24. Estadio de gástrula media de *Lytechinus pictus*, que muestra extensiones filopodiales del mesénquima secundario extendiéndose desde el extremo del arquenterón a la pared del blastocele. **A.** Células del mesénquima secundario extendiendo filopodios desde el extremo del arquenterón. **B.** Cables filopodiales que conectan la pared del blastocele con el extremo del arquenterón. La tensión de los cables puede verse cuando tiran sobre la pared del blastocele en el punto de adhesión. (Microfotografías cortesía de C. Ettensohn.)



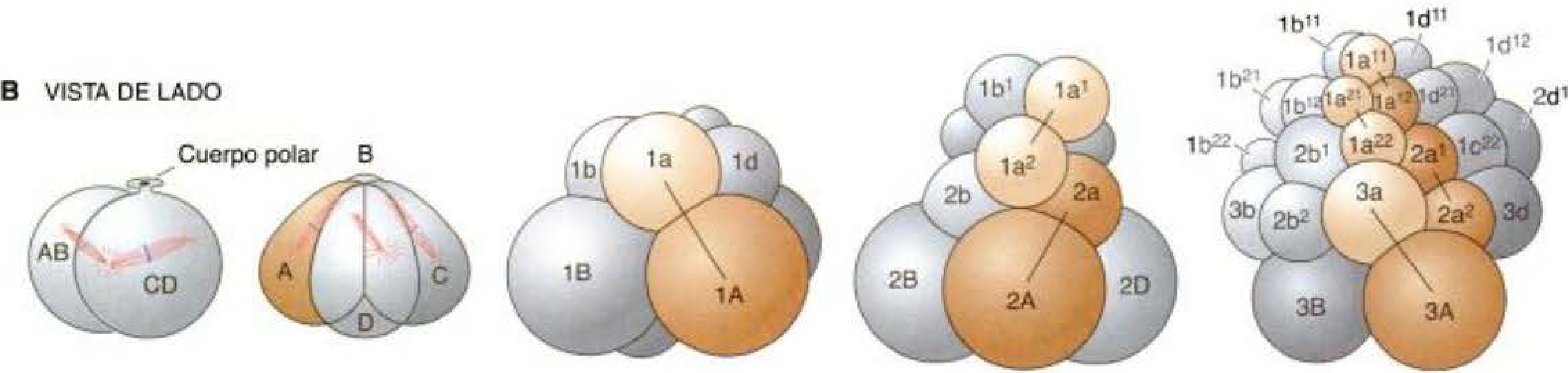


Fig. 8-25. Segmentación espiral del molusco *Trochus* visto **A**, desde el polo animal y **B**, desde uno de los lados. Las células derivadas de la blastómera A se muestran en color. El huso mitótico, representado en los estadios iniciales, divide las células desigualmente y en un ángulo los ejes vertical y horizontal.

célula de la blástula. Cuando los destinos de las blastómeras individuales de embriones de anélidos, gusanos planos y moluscos fueron comparados, muchas de las mismas células fueron vistas en los mismos lugares, y sus destinos generales fueron idénticos (Wilson 1898). La blástula producida por segmentación espiral no tiene blastocele y es denominada **estereoblástula**.

Las figuras 8-25 y 8-26 representan los patrones de segmentación típicos de muchos embriones de molusco. Las dos primeras segmentaciones son casi meridionales, y producen cuatro grandes macrómeras (marcadas A, B, C y D). En muchas especies, estas cuatro blastómeras tienen diferentes tamaños (D es la más grande), una característica que les permite ser identificadas individualmente. En cada segmentación sucesiva, desde cada macrómera brota una pequeña micrómera en su polo animal. Cada cuarteto sucesivo de micrómeras es desplazado a la derecha o a la izquierda de su macrómera hermana, creando el patrón espiral característico. Mirando hacia abajo sobre el embrión desde el polo animal, los extre-

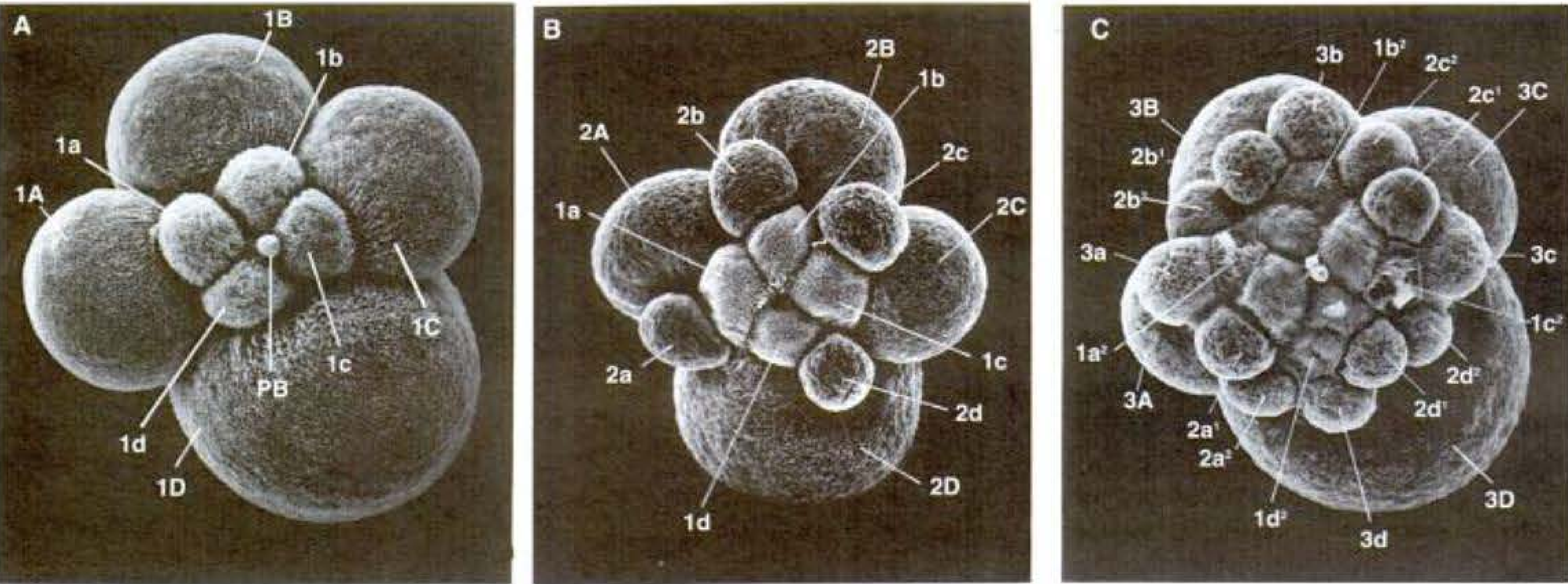


Fig. 8-26. Segmentación espiral del caracol *Ilyanassa*. La blastómera D es más grande que las otras, permitiendo la identificación de cada célula. La segmentación es dextral. **A.** Estadio de 8 células. PB, cuerpo polar. **B.** Mitad de la cuarta segmentación (embrión de 12 células). Las macrómeras ya se han dividido en grandes y pequeñas células orientadas espiralmente; 1a-d todavía no se han dividido. **C.** Embrión de 32 células. (De Craig y Morrill 1986; microfotografías cortesía de los autores.)

mos superiores de los husos mitóticos aparecen alternarnando en sentido horario y en sentido antihorario. Esta disposición lleva a que las micrómeras alternadas se formen oblicuamente a la izquierda y a la derecha de sus macrómeras.

En la tercera segmentación, la macrómera A da origen a dos células hijas, la macrómera 1A y la micrómera 1a. Las células B, C y D se comportan del mismo modo, y producen el primer cuarteto de micrómeras. En la mayoría de las especies, estas micrómeras están a la *derecha* de sus macrómeras (mirando hacia abajo sobre el polo animal). En la cuarta segmentación, la macrómera 1A se divide para formar la macrómera 2A y la micrómera 2a, y la micrómera 1a se divide para formar dos micrómeras más, $1a^1$ y $1a^2$. Las micrómeras de este segundo cuarteto están a la *izquierda* de las macrómeras. Segmentaciones posteriores producen las blastómeras 3A y 3a desde la macrómera 2A y la micrómera $1a^2$ se divide para producir las células $1a^{21}$ y $1a^{22}$. En el desarrollo normal, el primer cuarteto de micrómeras forma las estructuras de la cabeza, mientras que el segundo cuarteto forma el estatocisto (órgano del equilibrio) y la concha (caparazón). Estos destinos son especificados por localización citoplasmática y por inducción (Clement 1967; Cather 1967; Render 1991; Sweet 1998).

La orientación del plano de segmentación a la izquierda o a la derecha es controlada por factores citoplasmáticos dentro del ovocito. Esto fue descubierto mediante el análisis de mutaciones del enrollamiento del caracol. Algunos caracoles tienen sus vueltas o espirales abriéndose hacia la derecha de sus conchas (**enrollamiento dextral**), mientras que otros las tienen abriéndose a la izquierda (**enrollamiento sinistral**). En general, la dirección de enrollamiento es la misma en todos los miembros de una especie dada, pero ocasionalmente se encuentran mutantes. Por ejemplo, en una población de caracoles en la que las espirales se abren a la derecha, se podrán encontrar algunos individuos con espirales que se abren sobre la izquierda. Crampton (1894) analizó los embriones de tales caracoles aberrantes y encontró que su segmentación inicial difiere de la norma. La orientación de las células después de la segunda segmentación fue diferente en los caracoles con enrollamiento sinistral teniendo una orientación diferente del aparato mitótico (fig. 8-27). Todas las divisiones posteriores en el embrión que se enrolla a la izquierda fueron imágenes en espejo de aquellos embriones que se enrollan dextralmente. En la figura 8-27, se puede ver que la posición de la blastómera 4d (que es extremadamente importante, cuando su progenie formará los órganos mesodérmicos) es diferente en los dos tipos de embriones que están espiralizándose.

La dirección del enrollamiento de la concha del caracol es controlada por un solo par de genes (Sturtevant 1923; Boycott y col. 1930). En el caracol *Limnaea peregra*, la mayoría de los individuos están enrollados dextralmente. Mutantes poco comunes con enrollamiento sinistral fueron encontrados y apareados con caracoles tipo salvaje. Estos apareamientos mostraron que el alelo *D* de enrollamiento a la derecha es dominante al alelo *d* de enrollamiento a la izquierda. Sin embargo, la dirección de la segmentación no es determinada por el genotipo del caracol en desarrollo, sino por el genotipo del caracol materno. Un caracol hembra *dd* puede producir solo crías

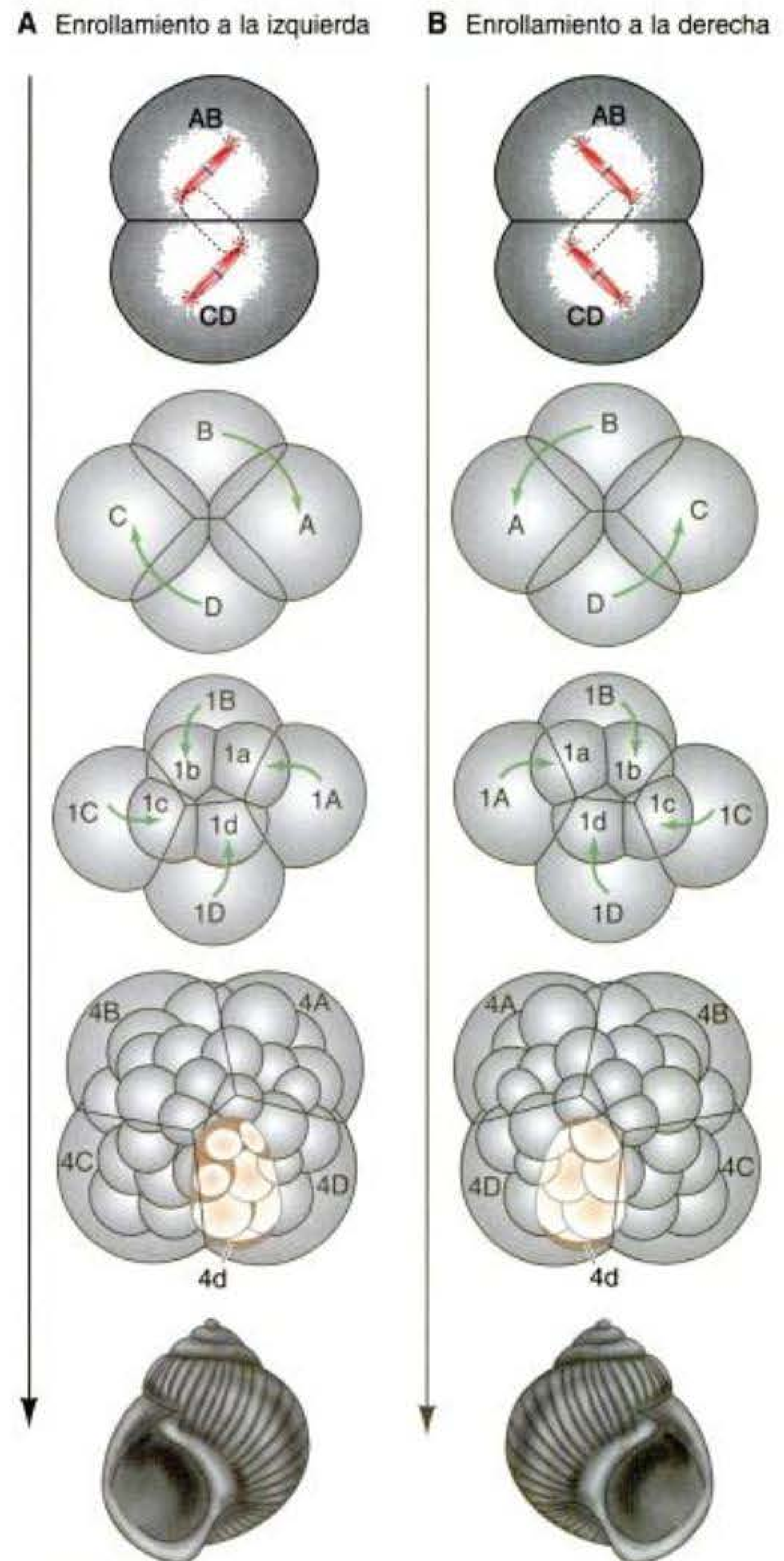


Fig. 8-27. Mirando hacia abajo sobre el polo animal de caracoles; **A**, enrollándose a la izquierda y **B**, enrollándose a la derecha. El origen del enrollamiento sinistral y dextral puede ser rastreado hasta la orientación del huso mitótico en la segunda segmentación. Los caracoles producen enrollamientos izquierdo y derecho como imágenes en espejo uno del otro. (Según Morgan 1927.)

enrolladas sinistralmente, incluso si el genotipo de las crías es *Dd*. Un individuo *Dd* se enrollará a la izquierda o a la derecha, según el genotipo de su madre. Tales apareamientos producen un gráfico como:

		Genotipo	*Fenotipo*
DD♀ × dd♂	→	Dd	Todos se enrollan a la derecha
DD♂ × dd♀	→	Dd	Todos se enrollan a la izquierda
Dd × Dd	→	1DD:2Dd:1dd	Todos se enrollan a la derecha

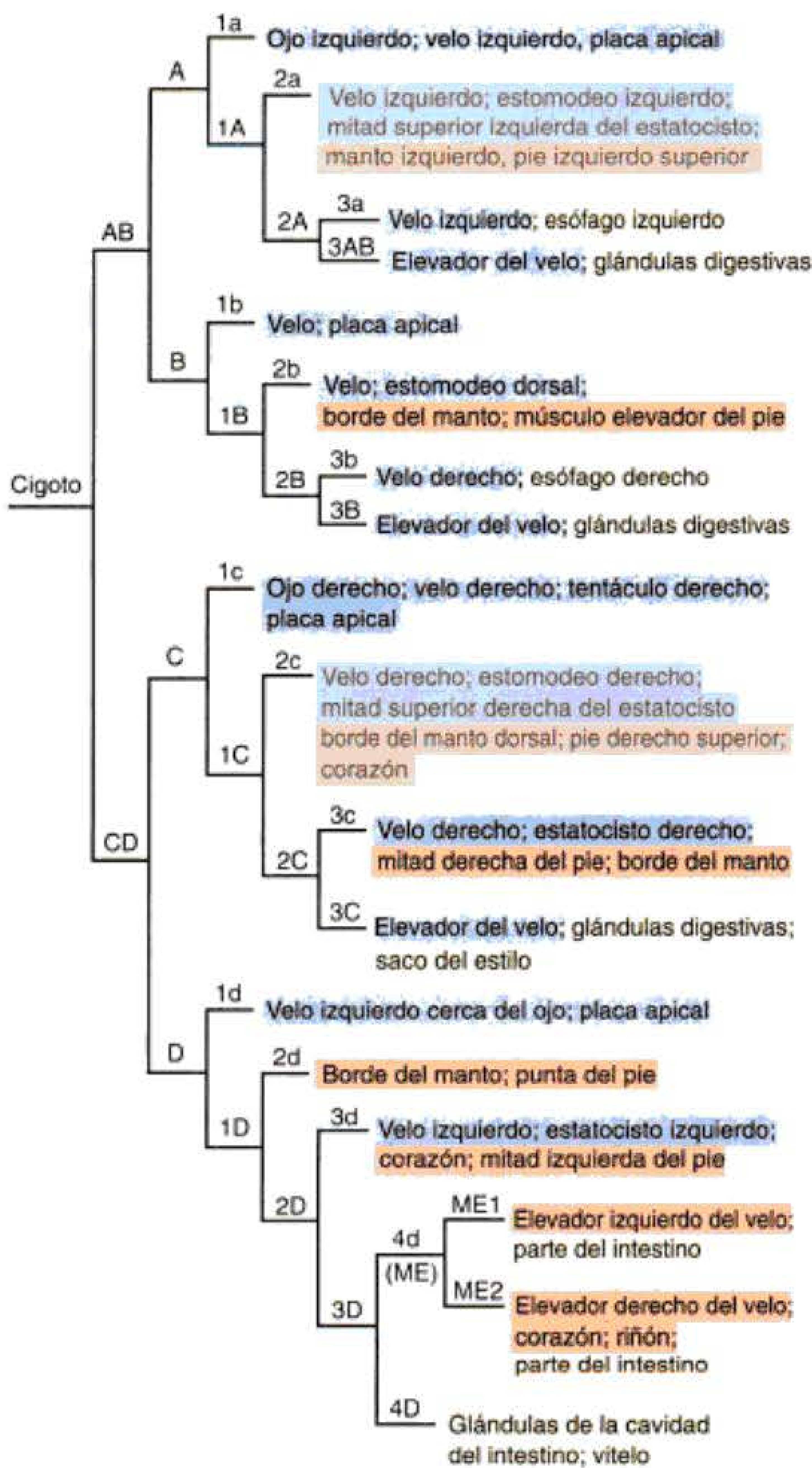


Fig. 8-28. Mapa de destino del caracol *Ilyanassa obsoleta*. Bolitas que contenían amarillo Lucifer fueron inyectadas en blastómeras individuales en el estadio de 32 células. Cuando los embriones se desarrollaron a larva, sus descendientes pudieron ser identificados por su fluorescencia. (Según Render 1997.)

Los factores genéticos involucrados en el enrollamiento del caracol son llevados al embrión por el citoplasma del ovocito. El genotipo del ovario en el que el ovocito se desarrolla determina qué orientación de segmentación tendrá lugar. Cuando Freeman y Lundelius (1982) inyectaron una pequeña cantidad de citoplasma a partir de caracoles enrollados dextralmente en los cigotos de madres *dd* (cigotos cuyo gameto femenino que le dio origen derivó de estas madres), los embriones resultantes se enrollaban a la derecha. El citoplasma desde los caracoles enrollados sinistralmente no afectaba a los embriones que se enrollaban a la derecha. Estos hallazgos confirmaron que las madres tipo salvaje colocaban un factor dentro de sus gametos femeninos que estaba ausente o era defectuoso en las madres *dd*.

SITIO WEB 8.3 **Alfred Sturtevant y la genética del enrollamiento del caracol (Alfred Sturtevant and the genetics of snail coiling).** Mediante un experimento magistralmente concebido, Sturtevant demostró el valor de aplicar la genética a la embriología. Para hacerlo, tomó la genética mendeliana para el estudio del enrollamiento del caracol.

Mapa de destino de Ilyanassa obsoleta

Joanne Render (1997) ha constituido un detallado mapa de destino del caracol *Ilyanassa obsoleta* mediante la inyección de micrómeras específicas con grandes polímeros conjugados con el marcador fluorescente amarillo Lucifer. La fluorescencia es mantenida durante el período de la embriogénesis y puede ser vista en el tejido larval derivado de las células inyectadas. El mapa de destino de Render (fig. 8-28) muestra que el segundo cuarteto de micrómeras (2a-d) generalmente contribuye al manto formador de la concha, el velo, la boca y el corazón. El tercer cuarteto de micrómeras (3a-d) genera grandes regiones del pie, del velo, del esófago y del corazón. La célula 4d –el mesentoblasto– contribuye con el riñón larval, el corazón, los músculos elevadores y el intestino.

Información adicional y especulaciones

Adaptación mediante la modificación de la segmentación embrionaria

La evolución es causada por la alteración hereditaria del desarrollo embrionario. A veces somos capaces de identificar una modificación de la embriogénesis que le permite al organismo sobrevivir en un ambiente que de otro modo le sería inhóspito. Una de estas modificaciones, descubierta por Frank Lillie en 1898, es producida por una alteración del patrón típico de segmentación espiral en la familia unionid de las almejas.

A diferencia de la mayoría de las almejas, *Unio* y sus parientes viven en corrientes de flujo rápido. Las corrientes crean un problema para la dispersión de las larvas: debido a que los adultos son sedentarios, las larvas que nadan libremente siempre serán llevadas corriente abajo por la corriente. Sin embargo, estas almejas se han adaptado a su ambiente por medio de dos modificaciones de su desarrollo. La pri-

mera es una alteración en la segmentación embrionaria. En la típica segmentación de molusco, todas las macrómeras son iguales en tamaño o la blastómera 2D es la célula más grande en el estadio embrionario. Sin embargo, la división celular en *Unio* es de modo tal que las blastómeras *2d* obtienen la mayor cantidad de citoplasma (fig. 8-29). Esta célula se divide para producir la mayor parte de las estructuras de la larva, incluyendo una glándula capaz de producir una gran concha. Las larvas resultantes (denominadas **gloquidia**) se asemejan a una minúscula trampa de oso; tienen pelos sensitivos que hacen que las valvas de la concha se cierren cuando son tocadas por las agallas o aletas de un pez errante. Las larvas se enganchan a un pez y "hacen dedo" con él hasta que están listas para caerse y metamorfosear en una almeja adulta. De este modo, pueden esparcirse corriente arriba.

En algunas especies de unionid, las gloquidias son liberadas desde la hembra a la bolsa de las crías y luego esperan pasivamente por un pez que nade hacia ellas. Algunas especies, como *Lampsilis ventricosa*, han incrementado las oportunidades para que sus larvas encuentren un pez mediante otra modificación del desarrollo (Welsh 1969). Muchas almejas desarrollan un manto delgado que envuelve la concha alrededor y rodea a la bolsa de las crías. En algunos unionids, la forma de la bolsa de las crías (marsupial) y las ondulaciones del manto imitan la forma y la conducta natatoria de un minnow (pequeño pez de agua dulce). Para hacer la decepción aún mejor, desarrollan una "mancha de ojo" negra en uno de los extremos y una "cola" que brilla en el otro. El "pez" en la figura 8-30 no es todo un pez, sino tan solo la bolsa de las crías y el manto de la almeja hembra debajo de ésta. Cuando un pez depredador es atraído dentro del rango de esta "presa," la almeja descarga las gloquidias desde la bolsa de las crías. Por lo tanto, la modificación de los patrones de desarrollo existentes les ha permitido a las almejas unionid sobrevivir en ambientes desafiantes.



Fig. 8-30. Pez falso encima de la almeja unionid *Lampsilis ventricosa*. El "pez" es en realidad la bolsa de las crías y el manto de la almeja. (Fotografía cortesía de J. H. Welsh).

SITIO WEB 8.4 **Modificaciones del destino celular en los huevos (cigotos) espirales (Modifications of cell fate in spiralian eggs).** Dentro de los gasterópodos, las diferencias en el tiempo del destino celular resultan en significativas diferencias del plan corporal. Además, en las sanguijuelas y nemertinos el patrón de segmentación espiral ha sido modificado para producir nuevos tipos de planes corporales.

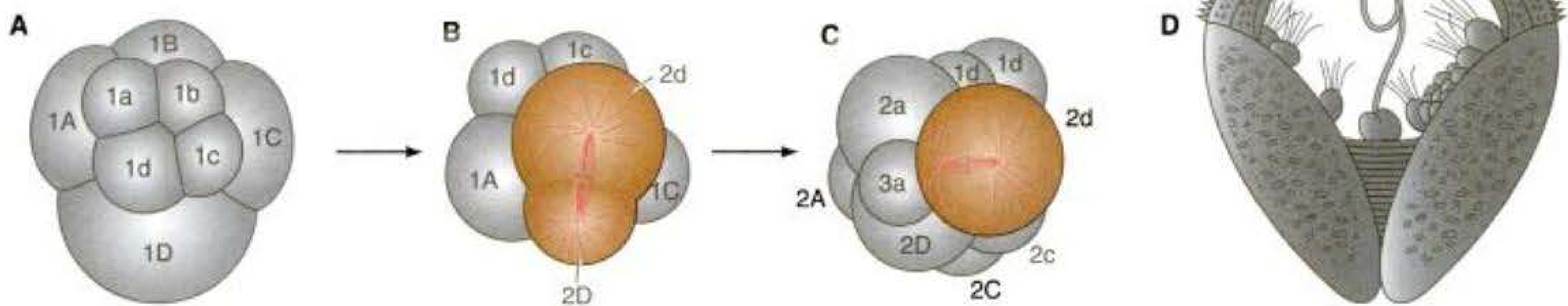


Fig. 8-29. Formación de la larva de glochidium mediante la modificación de la segmentación espiral. Después de formarse el embrión de 8 células (**A**), la ubicación del huso mitótico causa que la mayoría del citoplasma de D entre en la blastómera 2d (**B**). Esta gran blastómera 2d se divide (**C**), dando origen finalmente a una gran concha de "trampa de oso" de la larva (**D**). (Según Raff y Kaufman 1983.)

Lóbulo polar: determinación celular y formación del eje

Los moluscos proporcionan algunos de los ejemplos más impresionantes del desarrollo en mosaico, en el que las blastómeras son especificadas autónomamente y por localización citoplasmática, en la que los determinantes morfogenéticos son colocados en una región específica del ovocito (véase cap. 3). El desarrollo en mosaico está extendido a lo largo del reino animal, en especial en protostomas como anélidos, nematodos y moluscos, todos los cuales inician la gastrulación en el futuro extremo anterior y luego de solo unas pocas divisiones celulares.

En los moluscos, los mRNA para algunos factores de transcripción y factores paracrinos son colocados en células particulares mediante su asociación con ciertos cen-

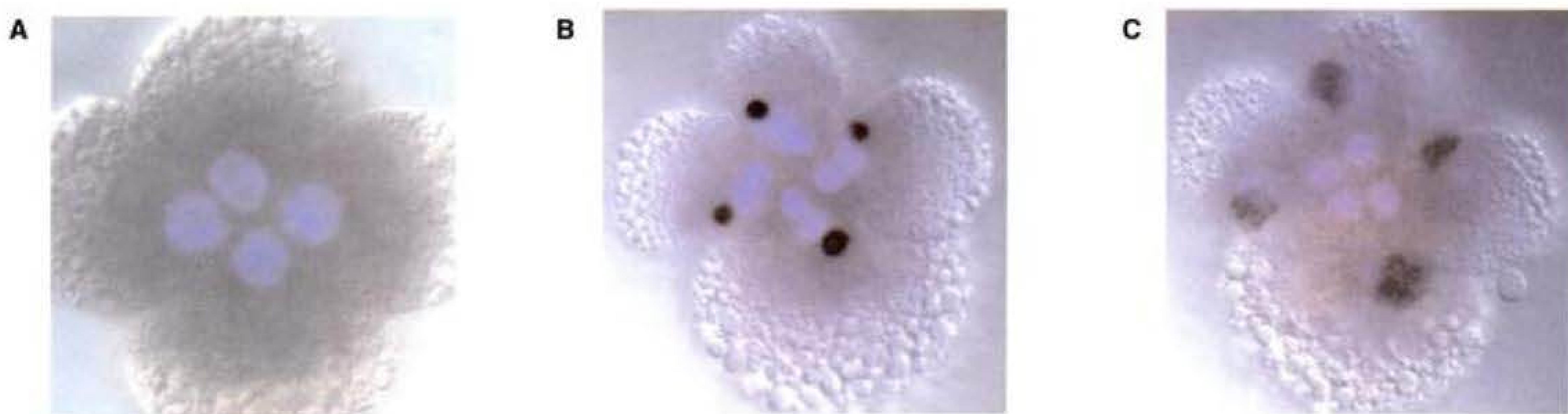
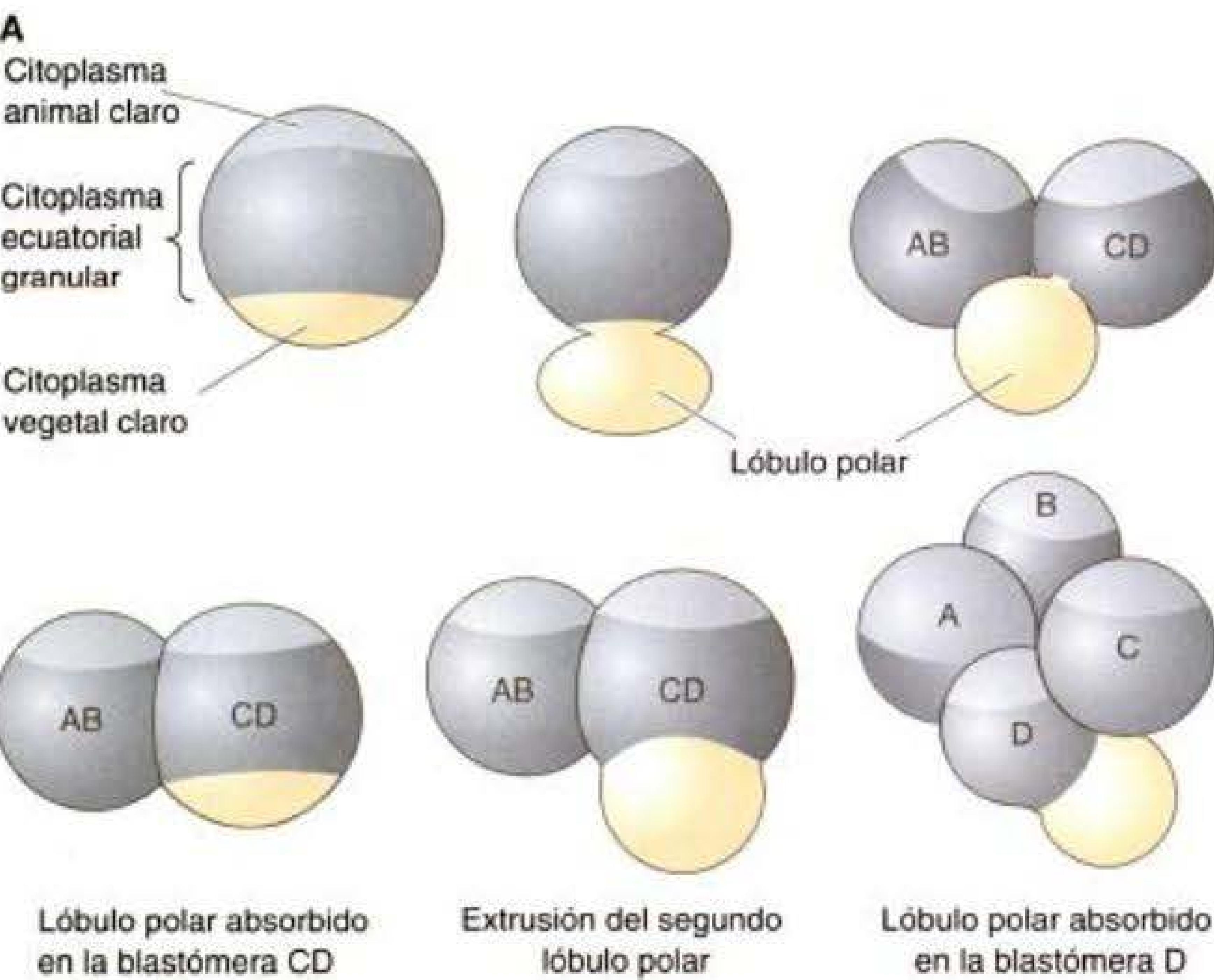


Fig. 8-31. Asociación del mRNA de *decapentaplegic (dpp)* con centrosomas específicos de *Ilyanassa*. **A.** La hibridación in situ del mRNA para el factor paracrino Dpp parecido al BMP en el embrión de caracol de 4 células no muestra acumulación de *Dpp*. **B.** En la profase del estadio de 4 a 8 células, el mRNA de *dpp* (negro) se acumula en uno de los centrosomas del par que forman el huso mitótico. **C.** A medida que continúa la mitosis, se ve al mRNA de *dpp* asistiendo al centrosoma en la macrómera en lugar del centrosoma en la micrómera de cada célula. El mensajero de *dpp* codifica un factor paracrino tipo BMP crítico para el desarrollo de moluscos. (De Lambert y Nagy 2002; microfotografías cortesía de L. Nagy.)

trosomas (fig. 8-31; Lambert y Nagy 2002). En otros casos, las moléculas que establecen el patrón parecen estar unidas a ciertas regiones del huevo (en estadio de cigoto) que formarán el **lóbulo polar**.

E. B. Wilson y su estudiante H. E. Crampton demostraron que el desarrollo en mosaico caracteriza al desarrollo temprano de los embriones de moluscos (véase fig. 3-7). Observaron que ciertos embriones que se segmentan espiralmente (la mayoría de los filos de moluscos y anélidos) extruden un bulbo de citoplasma inmediatamente antes de la primera segmentación (fig. 8-32). Esta protrusión es el **lóbulo polar.** En algunas especies de caracoles, la región que está uniendo el lóbulo polar al resto del cigoto se convierte en un delgado tubo. La primera segmentación separa al cigoto asimétricamente, de modo tal que el lóbulo polar está conectado solamente a



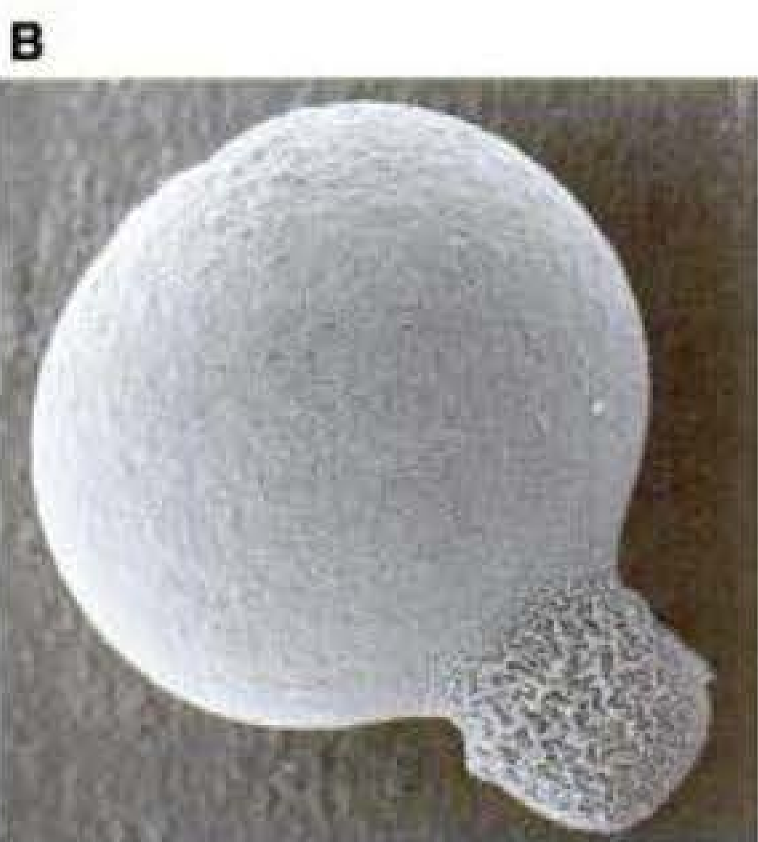




Fig. 8-32. Formación del lóbulo polar en ciertos embriones de moluscos. **A.** Segmentación. La extrusión y reincorporación del lóbulo polar se produce dos veces. **B.** Microfotografía electrónica de barrido de un lóbulo polar extendiéndose en un cigoto sin segmentar de *Buccinum undatum*. Las crestas superficiales están confinadas a la región del lóbulo polar. **C.** Sección a través de la primera segmentación, o estadio de trébol, del embrión de *Dentalium*. La flecha indica al gran cuerpo polar. (**A**, según Wilson 1904; fotografías cortesía de M. R. Dohmen.)

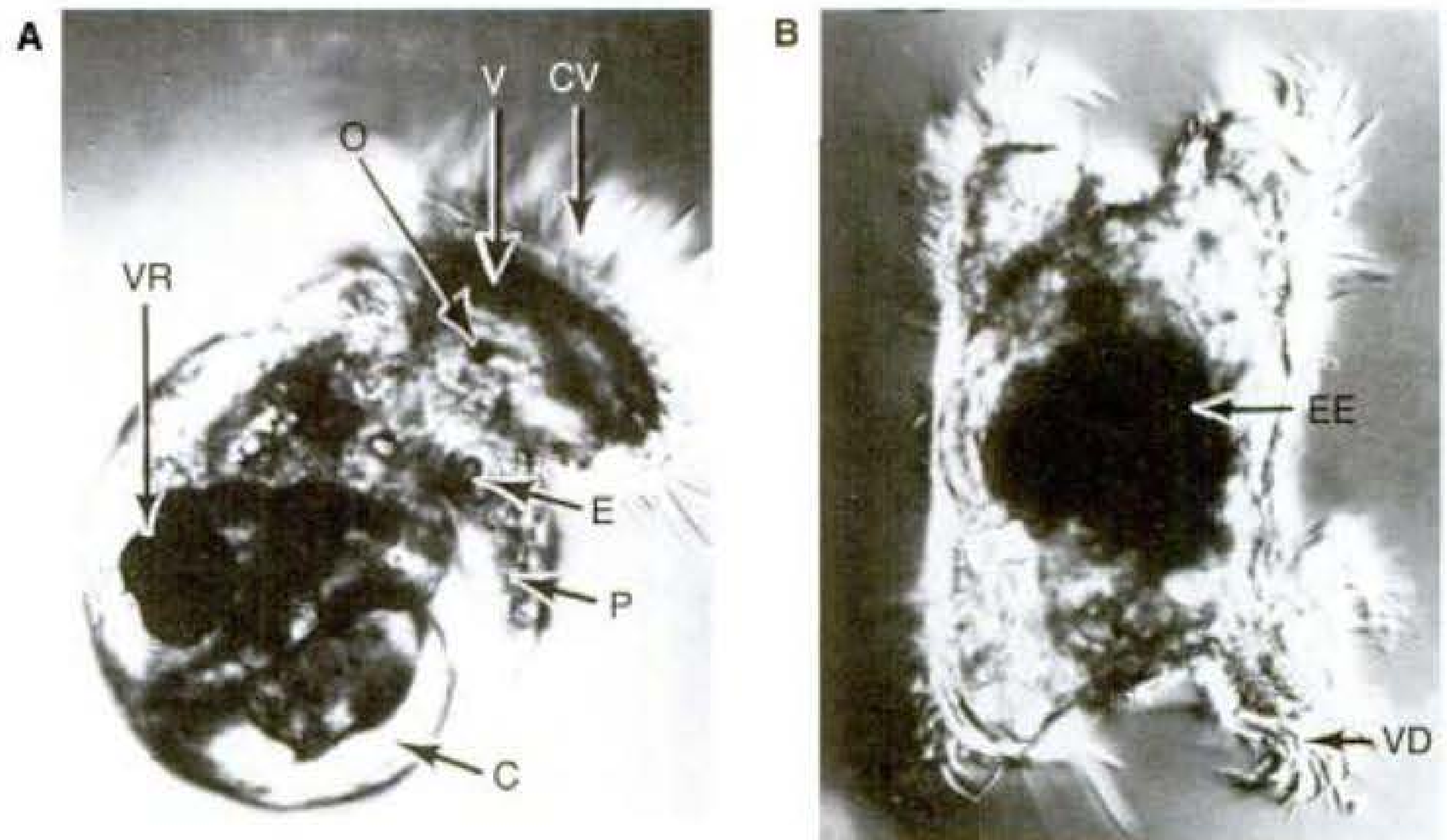


Fig. 8-33. Importancia del lóbulo polar en el desarrollo de *Ilyanassa*. **A.** Larva trocófora normal. **B.** Larva anormal, típica de las que se producen cuando es eliminado el lóbulo polar de la blastómera D. (O, ojo; P, pie; C; concha; E, estatocisto, un órgano del equilibrio; V, velo; CV, cilios del velo; VR, vitelo residual; EE, estomodeo evertido; VD, velo desorganizado.) (De Newrock y Raff 1975; microfotografías cortesía de K. Newrock.)

la blastómera CD. En varias especies, cerca de un tercio del total del volumen del citoplasma está contenido en este lóbulo enucleado, dándole la apariencia de otra célula. La estructura trilobular resultante es referida a menudo como el embrión en **estadio de trébol** (fig. 8-32C). La blastómera CD absorbe el material del lóbulo polar, pero lo extrude nuevamente previo a la segunda segmentación. Después de su división, el lóbulo polar se adhiere solo a la blastómera D, que absorbe su material. A partir de entonces, no se forma ningún lóbulo polar.

Crampton (1896) demostró que si se elimina el lóbulo polar en el estadio de trébol, las células remanentes se dividen normalmente. Sin embargo, en lugar de producir una larva trocofora normal,* producen una larva incompleta, careciendo completamente de endodermo (intestino), de órganos mesodérmicos (como el corazón y los músculos elevadores), así como de algunos órganos ectodérmicos (como los ojos) (véase fig. 8-33). Además, Crampton demostró que el mismo tipo de larva anormal puede producirse al extirpar la blastómera D en el embrión de cuatro células. Crampton concluyó que el citoplasma del lóbulo polar contiene determinantes endodérmicos y mesodérmicos, y que estos determinantes le dan a la blastómera D su capacidad formadora de endomesodermo. También demostró que la localización de los determinantes mesodérmicos es establecida poco después de la fecundación, de este modo demostró que una región citoplasmática específica del cigoto, destinada para ser incluida en la blastómera D, contiene los factores necesarios para el ritmo de segmentación especial de la blastómera D y para la diferenciación del mesodermo.

Estudios de centrifugación (Clement 1968) demostraron que los determinantes morfogenéticos secuestrados dentro del lóbulo polar probablemente están localizados en el citoesqueleto o en la corteza, sin encontrarse en el citoplasma difusible del lóbulo. Van den Biggelaar (1977) obtuvo resultados similares cuando extirpó el citoplasma del lóbulo polar con una micropipeta. El citoplasma de otras regiones de la célula se desplazó hacia el lóbulo polar, sustituyendo la porción eliminada. Estos embriones continuaban desarrollándose normalmente. Además, cuando se agregó el citoplasma difusible del lóbulo polar a la blastómera B, no se observó duplicación de estructuras (Verdonk y Cather 1983). Por lo tanto, la parte difusible del citoplasma del lóbulo polar no contiene los determinantes morfogenéticos; probablemente éstos se localicen en el citoplasma cortical no fluido o sobre el citoesqueleto.

Clement (1962) también analizó cómo continuaba el desarrollo de la blastómera D con la finalidad de observar las posteriores asignaciones de estos determinantes. El desarrollo de la blastómera D puede ser trazado en la figura 8-26. Esta macrómera es más grande que las otras tres debido a que ha recibido el contenido del lóbulo polar. Cuando se extirpa la blastómera D o la primera o segunda macrómera originadas a partir de ésta (1D o 2D), se obtiene una larva incompleta, carente de corazón, intestino y velo (el borde ciliado de la larva), glándula de la concha, ojos y pie. Éste es esencialmente el mismo fenotipo que se obtiene cuando se extirpa el lóbulo polar. Debido que las blastómeras D no contribuyen directamente con células para muchas de estas estructuras, parece ser que las macrómeras del cuadrante D están involucradas en inducir a que otras células adquieran estos destinos.

Cuando se elimina la blastómera 3D poco tiempo después de la división de la célula 2D para formar las blastómeras 3D y 3d, la larva producida tiene aspecto semejante al de las formadas por la eliminación de las macrómeras D, 1D o 2D. Sin embargo, la extirpación de la blastómera 3D en una etapa tardía produce una larva casi normal, con ojos, pie, velo y alguna glándula de la concha, pero sin corazón o intestino (fig. 8-33). Luego de originarse la célula 4d (mediante la división de la blastómera 3D), la eliminación del derivado D (la célula 4D) no produce diferencias cualitativas en el desarrollo. En realidad, todos los determinantes esenciales para la formación del corazón e intestino se encuentran ahora en la blastómera 4d, y la eliminación de esta célula da como resultado una larva sin corazón y sin intestino (Clement 1986). La blastómera 4d es responsable de la formación (en su siguiente división) de dos **mesentoblastos**, las células que dan origen a los órganos mesodérmicos (corazón) y endodérmicos (intestino).

* El **trocoforo** (griego, *trochos*, "rueda") es una forma larval planctónica (nada libremente) hallada entre los moluscos y varios otros phyla de protostomas con segmentación espiral, más notablemente en los gusanos anélidos marinos.

Los determinantes mesodérmicos y endodérmicos de la macrómera 3D son transferidos a la blastómera 4d, mientras que la capacidad inductiva de la blastómera 3D (para inducir por ejemplo ojos y glándula de la concha) es necesaria durante el tiempo que es formada la célula 3D, pero esta capacidad no es requerida con posterioridad. La célula 3D parece activar la vía de señalización MAP cinasa en las micrómeras por arriba de ella (fig. 8-34; Lambert y Nagy 2001; véase además cap. 6). Si las células son teñidas para MAP cinasa, la tinción es vista en aquellas células que requieren para su diferenciación normal de la señal originada a partir de la macrómera 3D. La eliminación de 3D impide la señalización de la MAP cinasa y si esta señalización es bloqueada por inhibidores específicos, la larva obtenida se parece precisamente a las formadas mediante la supresión de las blastómeras D (véase fig. 8-33). Por lo tanto, la macrómera 3D parece activar la cascada de MAP cinasa en las micrómeras ectodérmicas localizadas por arriba de ésta (formadoras de ojo y de la glándula de la concha).

Además de su papel en la diferenciación celular, el material del lóbulo polar también es responsable de la especificación de la polaridad dorsoventral (espalda-vientre) del embrión. Cuando el material del lóbulo polar es forzado a pasar hacia la blastómera AB así como hacia la blastómera CD, se forman larvas gemelas que están unidas sobre sus superficies ventrales (Guerrier y col. 1978; Henry y Martindale 1987).

Para resumir, los experimentos han demostrado que el citoplasma del lóbulo polar sin capacidad de difusión es extremadamente importante en el desarrollo del molusco normal por varias razones:

- Contiene los determinantes para el ritmo apropiado de segmentación y la orientación de segmentación de la blastómera D.
- Contiene ciertos determinantes (los que se incorporan al blastómero 4d y que por lo tanto son conducidos a los mesentoblastos) para la diferenciación autónoma del mesodermo y del intestino.
- Es responsable de permitir que las interacciones inductivas (a través del material que entra en la blastómera 3D) lleven a la formación de la glándula de la concha y del ojo.
- Contiene los determinantes necesarios para la especificación del eje dorsoventral en el embrión.

Aunque el lóbulo polar es claramente importante en el desarrollo normal del caracol, todavía no se conocen los mecanismos para la mayoría de sus efectos. Una posible clave ha sido proporcionada por Atkinson (1987), que observó células diferenciadas del velo, del sistema digestivo y de la glándula de la concha dentro de los embriones sin lóbulo. Pero aun cuando los embriones sin lóbulo pueden producir estas células, ellas parecen incapaces de organizarse en tejidos y órganos funcionales. Los tejidos del tracto digestivo pueden ser encontrados, pero no están conectados; las células musculares se hallan dispersas alrededor de la larva sin lóbulo, pero no están organizadas en tejido muscular funcional. Por lo tanto, las funciones del desarrollo del lóbulo polar son probable-

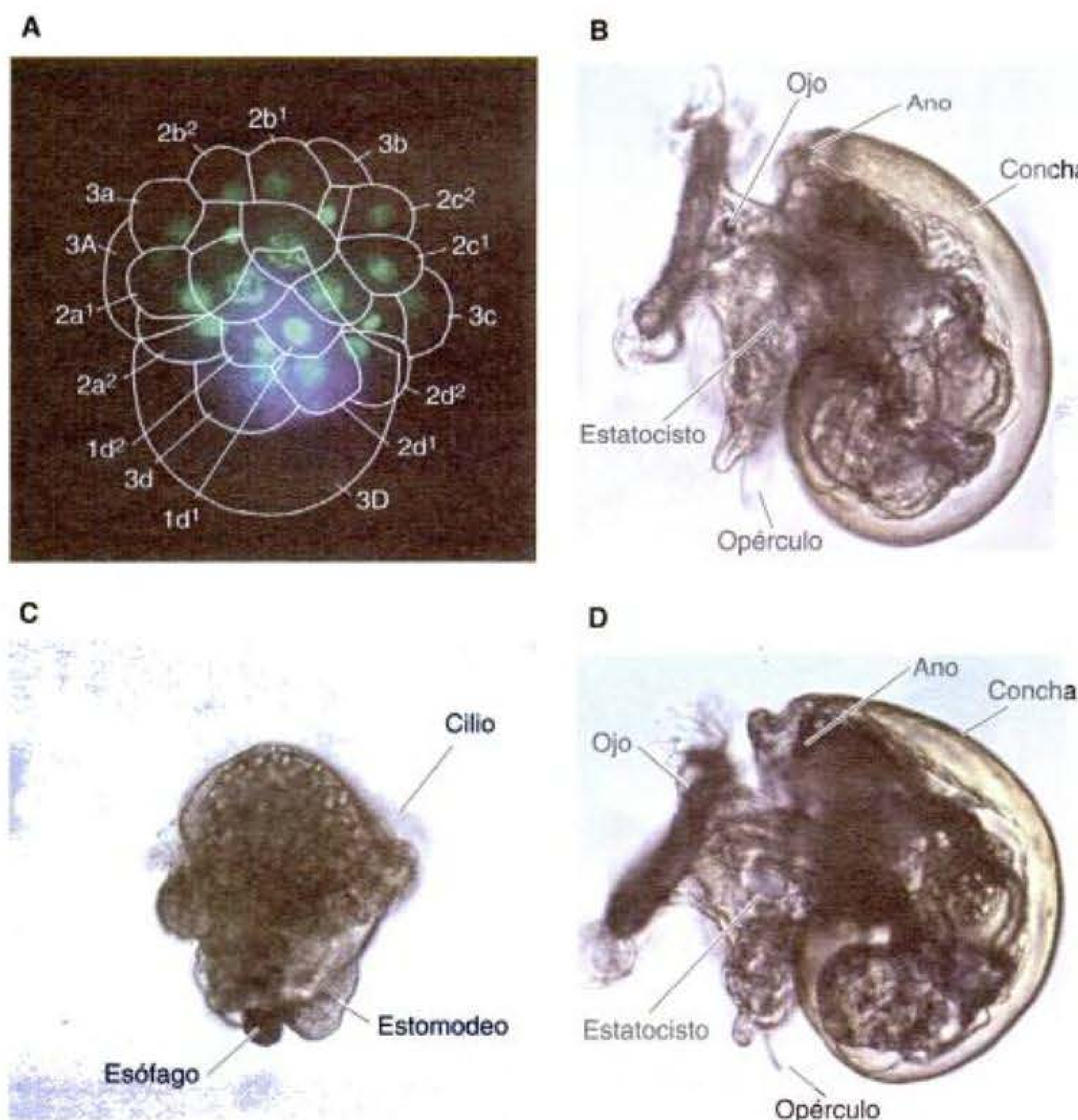


Fig. 8-34. La blastómera 3D estimula la actividad de la MAP cinasa en micrómeras adyacentes. **A.** La MAP cinasa activada (tinción azul) puede observarse en la macrómera 3D y en las micrómeras por encima de ésta (1a-d^1,$1d^2$, $2d^1$, $2d^2$, 3d). Los núcleos están contrateñidos de verde y los límites celulares han sido superpuestos sobre la imagen fotográfica. La tinción fue hecha 30 minutos después de la formación de la macrómera 3D. **B.** La larva control crece hasta el estadio de larva veliger. **C.** Algunas larvas tratadas con inhibidor de MAP cinasa 15 minutos después de que se formó la blastómera 3D. La concha, el ojo, el estatocisto y el opérculo no se han desarrollado. **D.** El mismo estadio de la larva tratado con inhibidor de la MAP cinasa a los 150 minutos después de la formación de 3D (poco antes de la formación de 4D). Esta larva tenía todos los órganos inducidos por la macrómera 3D. (Según Lambert y Nagy 2001.)

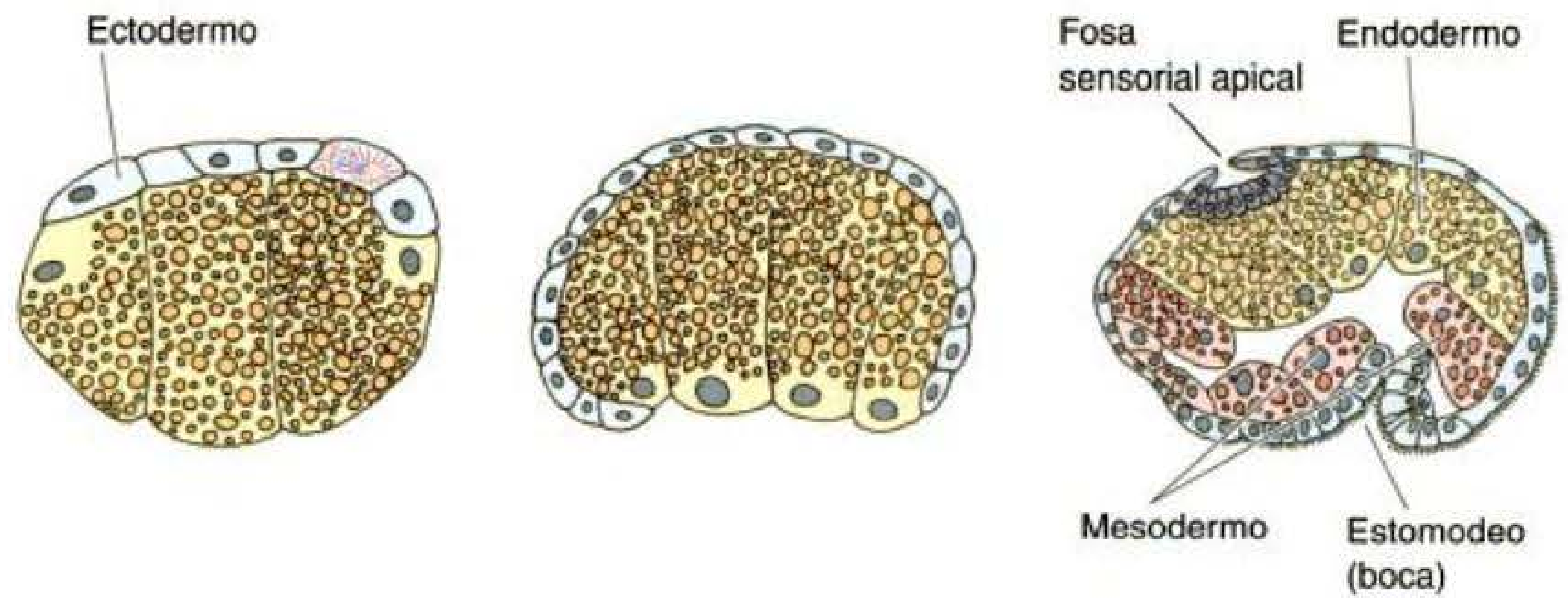


Fig. 8-35. Gastrulación en *Crepidula.* El ectodermo experimenta epibolia desde el polo animal y envuelve a las otras células del embrión. (Según Conklin 1897.)

mente muy complejas y pueden ser esenciales para la formación del eje.

Gastrulación en el caracol

La estereoblástula del caracol es relativamente pequeña, y sus destinos celulares ya han sido determinados por la serie D de las macrómeras. La gastrulación es lograda primariamente por epibolia, por la cual las micrómeras del casquete animal se multiplican y "cubren" a las macrómeras vegetales. Finalmente, las micrómeras cubrirán el embrión en su totalidad, dejando una pequeña hendidura en el polo vegetal (fig. 8-35; Collier 1997).

DESARROLLO TEMPRANO EN LOS TUNICADOS

Segmentación en los tunicados

Las ascidias, miembros del subfilo tunicados, son animales fascinantes por varias razones, pero la más importante es que son cordados invertebrados. Tienen una notocorda cuando son larvas (y por esta razón son cordados), pero carecen de vértebras. Mientras son larvas, son renacuajos que nadan libremente; pero cuando el renacuajo experimenta la metamorfosis, se pega al suelo marino, su cordón neural y su notocorda se degeneran y secreta una túnica de celulosa (que le da el nombre de "tunicados" a estas criaturas).

Estos animales están caracterizados por una **segmentación holoblástica bilateral**, un patrón hallado primariamente en los tunicados (fig. 8-36). La característica más llamativa de este tipo de segmentación es que el primer plano de segmentación establece el eje más temprano de simetría en el embrión, separando el embrión en sus futuros lados derecho e izquierdo. Cada división sucesiva se orienta en relación con este plano de simetría y la mitad del embrión formada sobre uno de los lados del primer plano de segmentación es la imagen en espejo de la mitad del embrión sobre el otro lado. La segunda segmentación es meridional, como la primera, pero a diferencia de ésta, no pasa a través del centro del huevo (huevo en el período de segmentación y que está formado por blastómeras). En su lugar, se generan dos células anteriores grandes (las blastómeras A y a) y dos células posteriores pequeñas (blastómeras B y b). Cada lado tiene ahora una blastómera grande y una pequeña. Durante las siguientes tres divisiones, las diferencias en el tamaño y en la forma de la célula destacan la simetría bilateral de estos embriones. En el estadio de 64 células, se forma un pequeño blastocele y comienza la gastrulación desde el polo vegetal. Los linajes celulares del tunicado *Styela partita* se muestran en la figura 1-7.

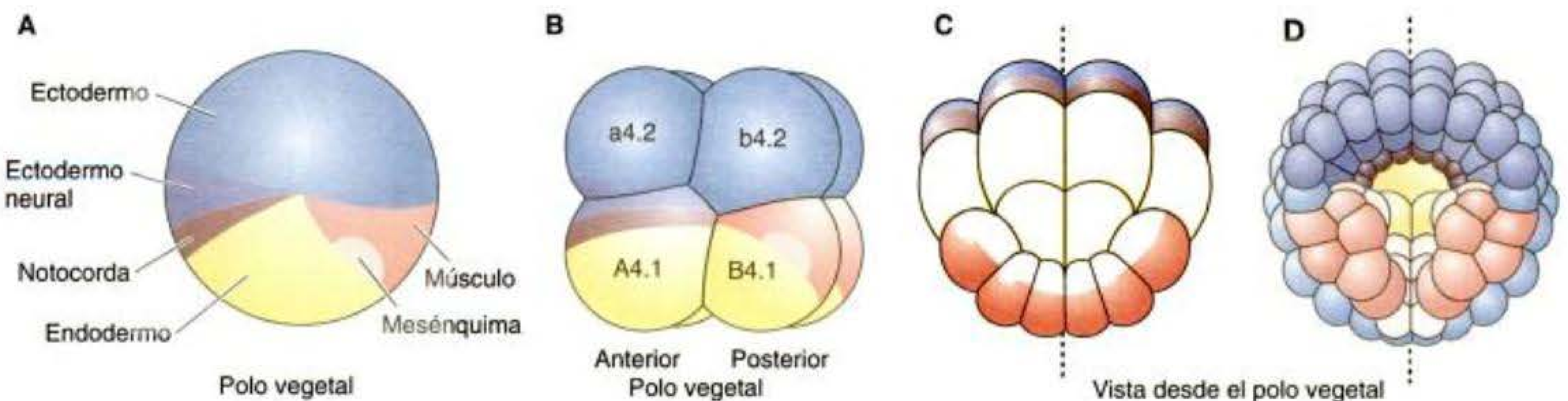


Fig. 8-36. Simetría bilateral en el huevo del tunicado *Styela partita.* **A.** Cigoto sin segmentar. Las regiones del citoplasma destinadas a formar órganos particulares aquí están marcadas y codificadas por colores en todos los diagramas. **B.** Embrión de 8 células que muestra a las blastómeras y a los destinos de varias células. El embrión puede verse como dos mitades de 4 células; de aquí en adelante, cada división del lado derecho del embrión tiene una división de imagen en espejo sobre la izquierda. **C, D.** Vistas de embriones tardíos desde el polo vegetal. La línea entrecortada muestra el plano de la simetría bilateral. (A, según Balinsky 1981.)

Mapa de destino del tunicado

Como se mencionó en el capítulo 3, los embriones tempranos de tunicado son especificados autónomamente, cada célula adquiere un tipo específico de citoplasma que determinará su destino. En tunicados tales como *Styela*, las diferentes regiones del citoplasma tienen distinta pigmentación y se puede ver fácilmente que los destinos celulares corresponden al tipo de citoplasma que ha hecho suyo cada una de las células. Estas regiones citoplasmáticas son proporcionadas al gameto femenino durante la fecundación. En el gameto femenino sin fecundar de *Styela partita*, un citoplasma gris central es envuelto por una capa cortical que contiene inclusiones lipídicas amarillas (fig. 8-37A). Durante la meiosis, la desaparición del núcleo libera una sustancia clara que se acumula en el hemisferio animal del cigoto. Dentro de los 5 minutos desde la entrada del espermatozoide, los citoplasmas claro interno y el amarillo cortical contactan en el hemisferio vegetal (más bajo) del cigoto (véase fig. 8-38). Cuando el pronúcleo masculino migra desde el polo vegetal al ecuador de la célula a lo largo del futuro lado posterior del embrión, las inclusiones lipídicas amarillas migran con éste. Esta migración forma una **medialuna amarilla**, que se extiende desde el polo vegetal hasta el ecuador (fig. 8-37B-D); esta región producirá la mayoría de los músculos de la cola de la larva de los tunicados. El movimiento de estas regiones citoplasmáticas depende de los microtúbulos que son generados por el centríolo del espermatozoide y de una onda de iones de calcio que contraerá al citoplasma del polo animal (Sawada y Schatten 1989; Speksnijder y col. 1990; Roegiers y col. 1995).

Edwin Conklin (1905) se aprovechó de la diferente coloración de estas regiones de citoplasma para seguir cada una de las células del embrión de tunicado hasta su destino en la larva (véase fig. 1-7). Encontró que las células que recibían citoplasma claro llegaban a ser ectodermo; las que contenían citoplasma amarillo daban origen a células del mesodermo; las que incorporaban inclusiones gris pizarra llegaban a ser endodermo; y las células gris claro se convertían en tubo neural y notocorda. Las regiones citoplasmáticas están localizadas bilateralmente alrededor del plano de simetría, de modo que son bisecadas por el primer surco de segmentación en las mitades derecha e izquierda del embrión. Esta segunda segmentación hace que el mesodermo prospectivo se localice en las dos células posteriores, mientras que el ectodermo neural y el cordamesodermo (notocorda) prospectivos serán formados a partir de dos células anteriores (véase fig. 8-36). La tercera división parte posteriormente a estas regiones citoplasmáticas de modo que las células formadoras de mesodermo son confinadas a las dos blastómeras vegetales posteriores, mientras que las células del cordamesodermo están restringidas a las dos células vegetales anteriores.

SITIO WEB 8.5 **El análisis experimental de la especificación celular del tunicado (The experimental analysis of tunicate cell specification).** Los investigadores que analizan el desarrollo del tunicado están utilizando sondas bioquímicas y moleculares para encontrar a los determinantes morfogenéticos que son segregados a las diferentes regiones del citoplasma del cigoto.

Especificación autónoma y condicional de las blastómeras de tunicado

Como se mencionó en el capítulo 3, la especificación autónoma de las blastómeras de tunicado fue una de las primeras observaciones en el campo de la embriología experimental (Chabry 1888). Reverberi y Minganti (1946) extendieron este análisis en una serie de experimentos de aislamiento y también observaron la autodiferenciación de cada blastómera aislada y del embrión restante. Los resultados de uno de estos experimentos se muestran en la figura 3-8. Cuando el embrión de 8 células es separado en sus cuatro dobletes (siendo los lados derecho e izquierdo equivalentes), se observan la especificación en mosaico y la condicional. El par posterior animal de las

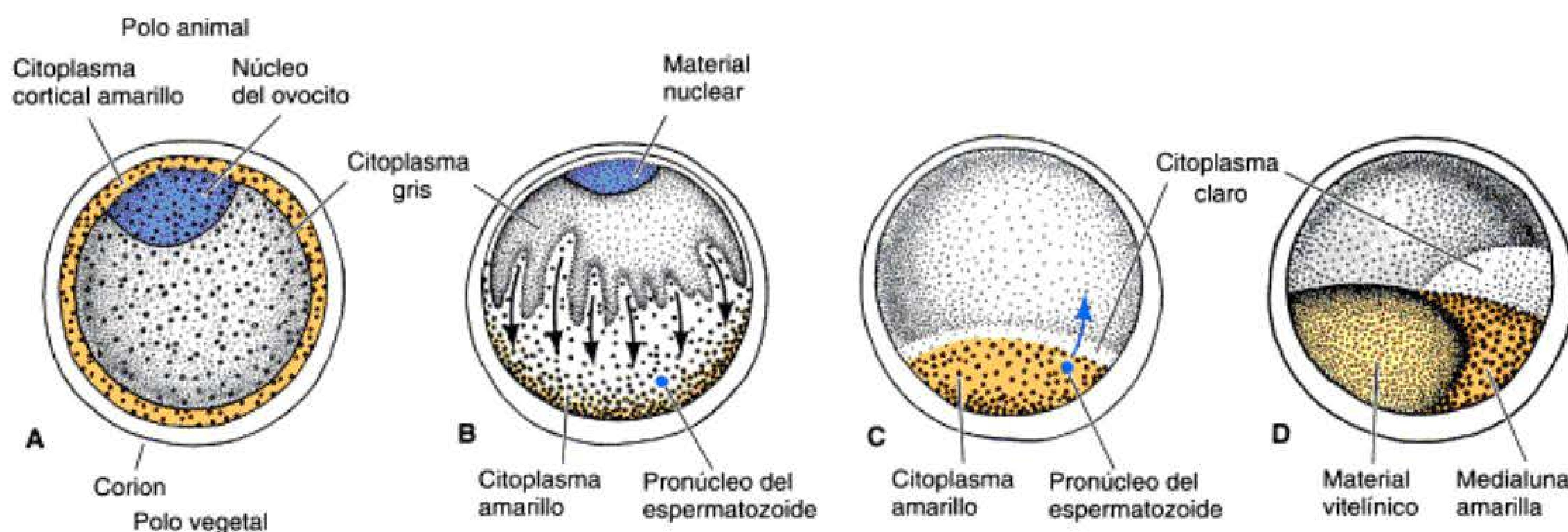


Fig. 8-37. Reorganización citoplasmática en el gameto femenino fecundado de *Styela partita*. **A.** Antes de la fecundación el citoplasma cortical amarillo rodea al citoplasma interno vitelínico gris. **B.** Después del ingreso del espermatozoide (en el hemisferio vegetal del ovocito), el citoplasma cortical amarillo y el citoplasma claro derivados de la desaparición del núcleo del ovocito se contraen vegetalmente hacia el espermatozoide. **C.** Cuando el pronúcleo del espermatozoide migra animalmente hacia el pronúcleo recién formado del gameto femenino, los citoplasmas amarillo y claro se mueven con éste. **D.** Las posiciones finales del citoplasma amarillo marcan la localización donde las células darán origen a los músculos de la cola. (Según Conklin 1905.)

blastómeras da origen al ectodermo, y el par posterior vegetal produce endodermo, mesénquima y tejido muscular, tal como se espera a partir del mapa de destino. La especificación autónoma se observa en el intestino endodérmico, en el músculo mesodérmico, en la piel ectodérmica y en el cordón neural del tunicado. La especificación condicional (mediante inducción) se ve en la formación del cerebro, la notocorda y en las células del mesénquima.

ESPECIFICACIÓN AUTÓNOMA DEL MIOPLASMA: LA MEDIALUNA AMARILLA. A partir de los estudios de linaje de Conklin y col. se supo que solo un par de blastómeras (vegetal posterior; B4.1) en el embrión de 8 células es capaz de producir tejido muscular de la cola. Estas células contienen el citoplasma de medialuna amarilla (fig. 8-38). Cuando este citoplasma es transferido desde la blastómera B4.1 (formadora de músculo) hacia la blastómera b4.2 (formadora de ectodermo) de un embrión de tunicado de 8 células, la blastómera formadora de ectodermo genera células musculares así como su progenie ectodérmica normal (Whittaker 1982; véase fig. 3-10). Además, el citoplasma a partir del área de la medialuna amarilla del cigoto puede hacer que la blastómera a4.2 exprese proteínas específicas de músculo (Nishida 1992a). Por el contrario, Tung y col. (1977) demostraron que cuando los núcleos celulares de la larva son trasplantados hacia fragmentos de huevos (siendo gametos femeninos o cigotos) de tunicados enucleados, las células nuevamente formadas muestran estructuras típicas de las de las regiones del huevo que proporcionaron el citoplasma, no de las que suministraron los núcleos. Se puede concluir, entonces, que ciertos determinantes que existen en el citoplasma del cigoto provocan la formación de ciertos tejidos. Estos determinantes morfogenéticos parecen funcionar mediante la activación (o inactivación) selectiva de genes específicos. La determinación de las blastómeras y la activación de ciertos genes están controladas por la localización espacial de los determinantes morfogenéticos dentro del citoplasma del cigoto.

Utilizando técnicas de hibridación de RNA, Nishida y Sawada (2001) encontraron que mRNA particulares estaban muy enriquecidos en el hemisferio vegetal del tunicado *Halocynthia roretzi*. Uno de estos mensajeros codifica un factor de transcripción dedo de cinc denominado **macho-1**. El mRNA *macho-1* fue hallado en alta concentración en el hemisferio vegetal en el gameto femenino sin fecundar y durante la fecundación temprana, y éste migraba con el citoplasma de medialuna amarilla hacia la región vegetal posterior del cigoto durante la segunda mitad del primer ciclo celular. Hacia el estadio de 8 células, el mRNA *macho-1* fue hallado solamente en las blastómeras B4.1. En los estadios de 16 a 32 células, éste se vio solamente en las blastómeras que dan origen a las células del músculo (fig. 8-39).

Cuando se inyectaron oligonucleótidos antisentido en gametos femeninos sin fecundar para agotar el mRNA *macho-1* del embrión, la larva de tunicado resultante carecía de todos los músculos generalmente formados por los descendientes de las blastómeras B4.1. (Tenían realmente los músculos secundarios que eran generados mediante las interacciones de las blastómeras A4.1 y b4.2.) Las colas de estas larvas con *macho-1* disminuido estaban severamente acortadas, pero las otras regiones de los

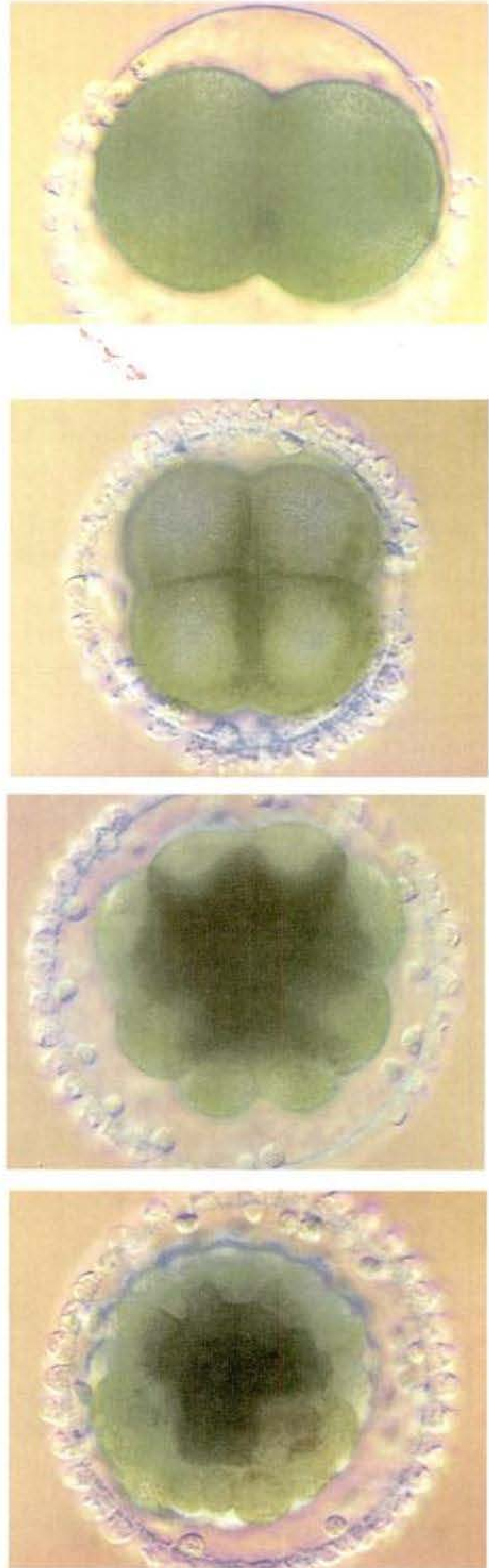


Fig. 8-38. Segregación citoplasmática en el cigoto de *Styela partita*. La medialuna amarilla, vista originalmente en el polo vegetal, llega a segregarse en el par de blastómeras B4.1 y desde allí a las células musculares. (Microfotografía cortesía de J. R. Whittaker.)

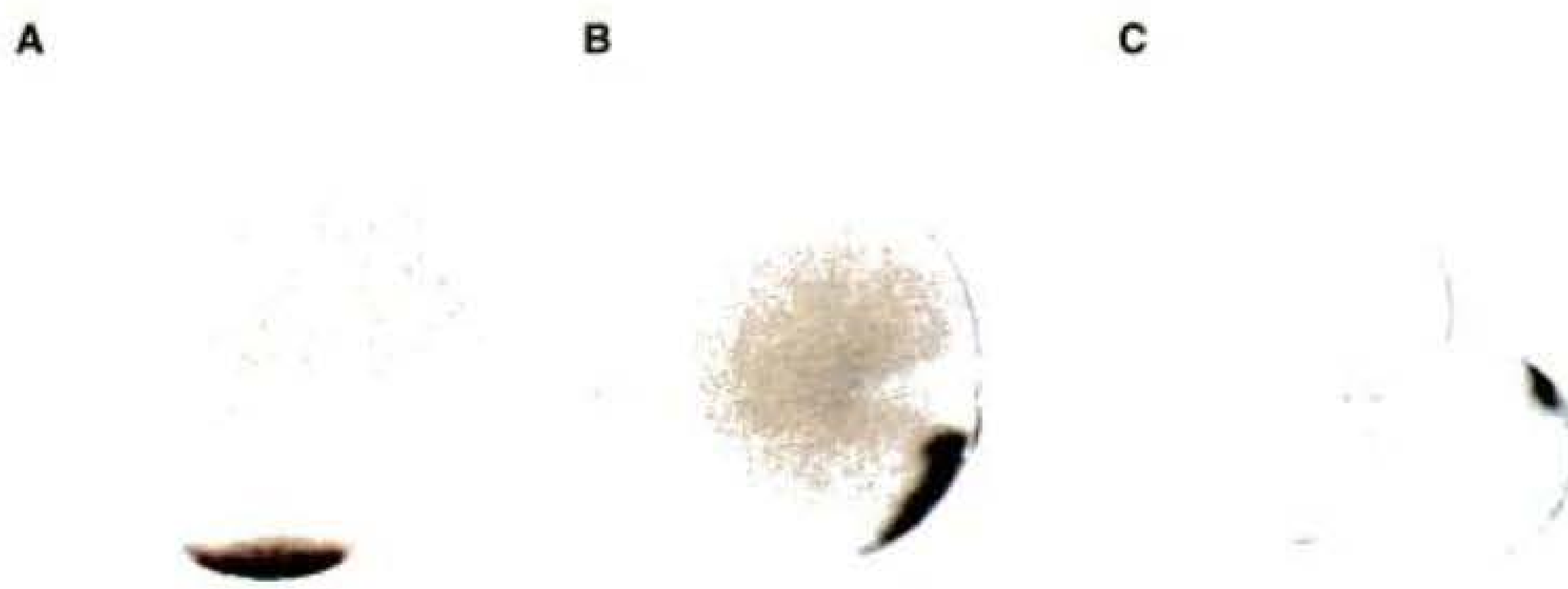


Fig. 8-39. Especificación autónoma por un factor morfogenético. El mRNA mensajero *macho-1* es localizado hacia el citoplasma de tunicado formador de músculo. Hibridación in situ que muestra al mensajero *macho*-1 hallado primero en el citoplasma del polo vegetal **(A)**, luego migrando hacia la superficie posterior presuntiva del cigoto **(B)** y llegando a localizarse en la blastómera B4.1 **(C)**. (De Nishida y Sawada 2001; microfotografía cortesía de H. Nishida y N. Satoh.)

renacuajos parecían normales, de manera estructural y bioquímica. Además, blastómeras B4.1 aisladas a partir de embriones con *macho-1* disminuido no podían producir tejido muscular. A continuación Nishida y Sawada inyectaron el mRNA de *macho-1* en las células que *no* formarán músculo normalmente, y encontraron que estos precursores de ectodermo y endodermo generan células musculares cuando se les da mRNA de *macho-1*. Por lo tanto, el mensajero de *macho-1* es encontrado en el lugar correcto y en el momento apropiado, y estos experimentos sugieren que la proteína macho-1 es necesaria y suficiente para promover la diferenciación de músculo en ciertas células de ascidias.

Erives y Levine (2000) hallaron otro mRNA localizado en la medialuna amarilla. Este mensajero codifica el factor de transcripción de caja T **CiVegTR**. El mensajero *CiVegTR* migra con el citoplasma amarillo, llegando a ser incorporado finalmente en la blastómera B4.1 y la proteína CiVegTR se une al potenciador del gen *Snail* (caracol) específico de músculo. La proteína snail es importante para impedir la expresión de *Brachyury (T)* en las células musculares presuntivas, y es por lo tanto necesaria para impedir que los precursores de músculo se conviertan en células de la notocorda. Parece ser, entonces, que los factores de transcripción *CiVegTR* y *macho-1* son componentes del citoplasma formador de músculo de la medialuna amarilla de los tunicados. Es posible que funcionen juntos, con la proteína macho-1 instruyendo a las células para llegar a ser células musculares mientras que la proteína CiVegTR instruye a las células para que *no* se conviertan en notocorda.

ESPECIFICACIÓN AUTÓNOMA DEL ENDODERMO: β-CATENINA. El endodermo presuntivo se origina de las blastómeras vegetales A4.1 y B4.1. La especificación de estas células coincide con la localización de β-catenina, un factor de transcripción que se vio antes en la discusión sobre la especificación del endodermo del erizo de mar (véase fig. 8-13). La inhibición de la β-catenina en el embrión de ascidia resulta en la pérdida de endodermo y su reemplazo por ectodermo (fig. 8-40; Imai y col. 2001). Por el contrario, el aumento de la síntesis de β-catenina provoca un incremento en el endodermo a expensas del ectodermo (tal como en los erizos de mar). El factor de transcripción de la β-catenina parece funcionar mediante la activación de la síntesis del factor de transcripción de caja homeótica (*homeobox*) Lhx-3. La inhibición del mensajero de *Lhx-3* impide la diferenciación de endodermo (Satou y col. 2001).

ESPECIFICACIÓN CONDICIONAL DEL MESÉNQUIMA Y DE LA NOTOCORDA. Mientras que la mayor parte de los músculos son especificados de manera autónoma a partir del citoplasma de medialuna amarilla, las células muscu-

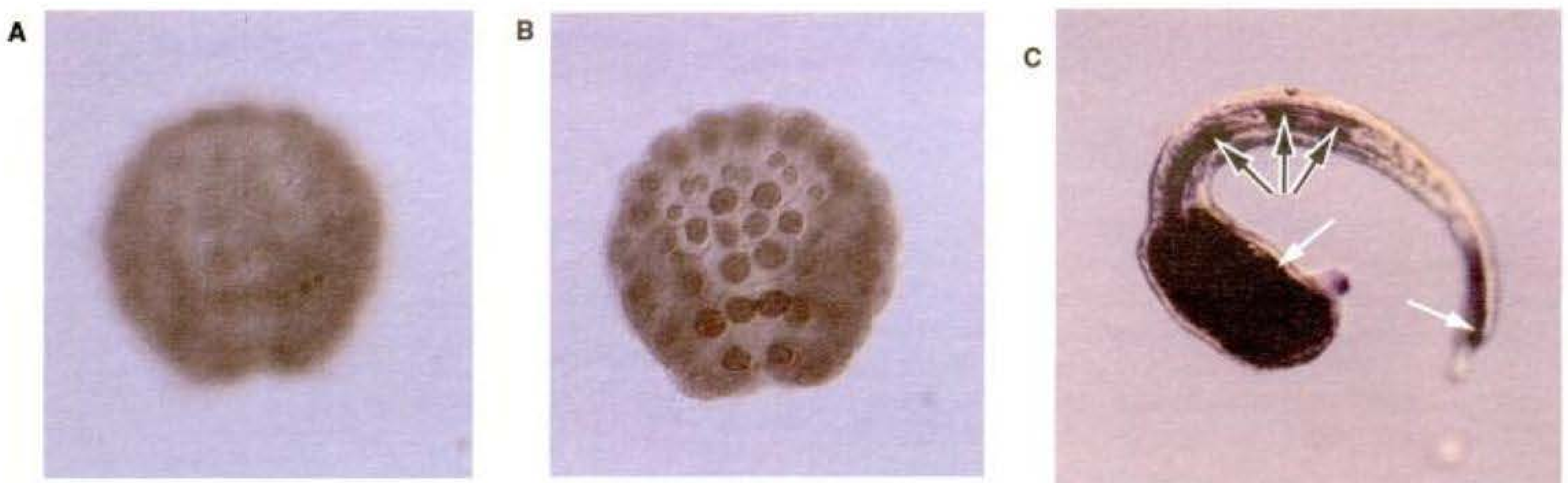


Fig. 8-40. La tinción de anticuerpos para la proteína β-catenina muestra su relación con la formación de endodermo. **A.** No se observa β-catenina en los núcleos del polo animal de un embrión *Ciona* de 110 células. **B.** En contraste, la β-catenina nuclear es vista inmediatamente en los núcleos de los precursores del endodermo vegetal en el estadio de 110 células. **C.** Cuando la β-catenina es expresada en los precursores celulares notocordales, aquellas células llegarán a ser endodermo y expresarán marcadores endodérmicos tales como fosfatasa alcalina. Las flechas blancas muestran un endodermo normal; las flechas negras muestran células notocordales que están expresando enzimas endodérmicas. (De Imai y col. 2000; microfotografías cortesía de H. Nishida y N. Satoh.)

lares más posteriores se forman por especificación condicional mediante interacciones celulares con los descendientes de las blastómeras A4.1 y b4.2 (Nishida 1987, 1992a,b). Además, los otros dos tipos principales de mesodermo –la notocorda y el mesénquima– también se forman por interacciones inductivas. En realidad, la notocorda y el mesénquima parecen ser inducidos por el mismo factor de crecimiento fibroblástico que es secretado por las células endodérmicas (Nakatani y col. 1996; Kim y col. 2000; Imai y col. 2002). Las células anteriores que llegarán a ser notocorda responden volviéndose competentes para recibir la señal BMP desde el endodermo (Darras y Nishida 2001). La señal de BMP hace que las células precursoras de la notocorda transcriban al gen *Brachyury*, que codifica un factor de transcripción que activa a los genes notocordales en todo el filo de los cordados (Jeffery y col. 1998; Hotta y col. 1999; Di Gregorio y col. 2001). Las células posteriores que se convertirán en mesénquima responden de modo diferente debido a la presencia de factores desde el citoplasma vegetal posterior. La señal FGF hacia el mesénquima también reprime la formación de músculo, otro papel que está conservado en los vertebrados.

Especificación de ejes embrionarios

Los ejes de la larva de tunicado están entre los asignados más tempranamente. En efecto, todos sus ejes embrionarios están determinados por el citoplasma del cigoto antes de la primera segmentación. El primer eje por ser determinado es el dorsoventral, que es definido por el casquete del citoplasma en el polo vegetal. Este casquete vegetal define el futuro lado dorsal de la larva y el sitio donde se inicia la gastrulación (Bates y Jeffery 1988). Cuando pequeñas regiones de citoplasma del polo vegetal fueron eliminadas de los cigotos (entre la primera y la segunda onda de movimientos citoplasmáticos del cigoto), los cigotos no gastrulaban ni formaban un eje dorsoventral.

El eje anteroposterior es el segundo en aparecer y también es determinado durante la migración del citoplasma del ovocito. La medialuna amarilla se forma en la región del cigoto que llegará a ser el lado posterior de la larva. Cuando aproximadamente el 10% del citoplasma de esta región vegetal posterior del cigoto fue eliminada después de la segunda onda de movimiento citoplasmático, la mayoría de los embriones no pudieron formar un eje anteroposterior. En su lugar, estos embriones se desarrollaron como larvas radialmente simétricas con destinos anteriores (fig. 8-41). Este citoplasma vegetal posterior (PVC) es "dominante" en relación con otros citoplasmas en los que cuando éste fue trasplantado hacia la región vegetal anterior del cigoto en el que se había eliminado su propio PVC, la región anterior de la célula se convirtió en la nueva posterior y el eje fue invertido (Nishida 1994).

El eje izquierda-derecha es especificado como consecuencia de estos dos primeros ejes y la primera segmentación divide el embrión en sus futuros lados derecho e izquierdo.

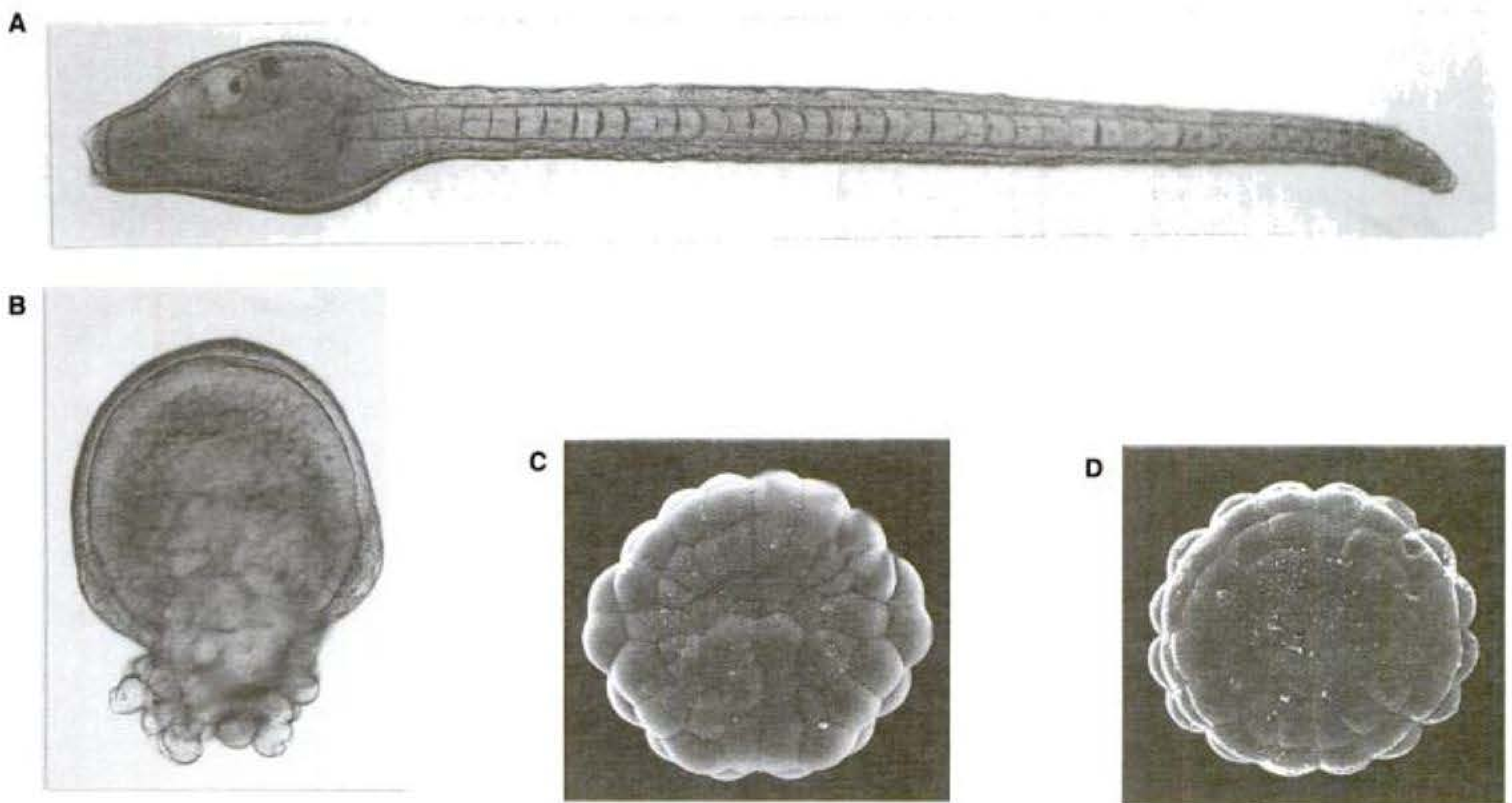


Fig. 8-41. Comparación de los embriones normales de tunicado y de embriones a partir de los cuales se había eliminado el citoplasma vegetal posterior. **A.** Larva tipo salvaje. **B.** Larva simétrica radialmente a partir de un cigoto en el que se había quitado el citoplasma vegetal posterior. La larva no tiene eje anteroposterior. Ésta consiste en una capa epidérmica externa, una masa notocordal central y una capa endodérmica situada en una posición intermedia. **C.** Vista vegetal de un embrión normal de 76 células. **D.** Vista vegetal de un embrión radialmente simétrico cuyas células vegetales posteriores fueron eliminadas. (De Nishida 1994; microfotografías cortesía de H. Nishida.)

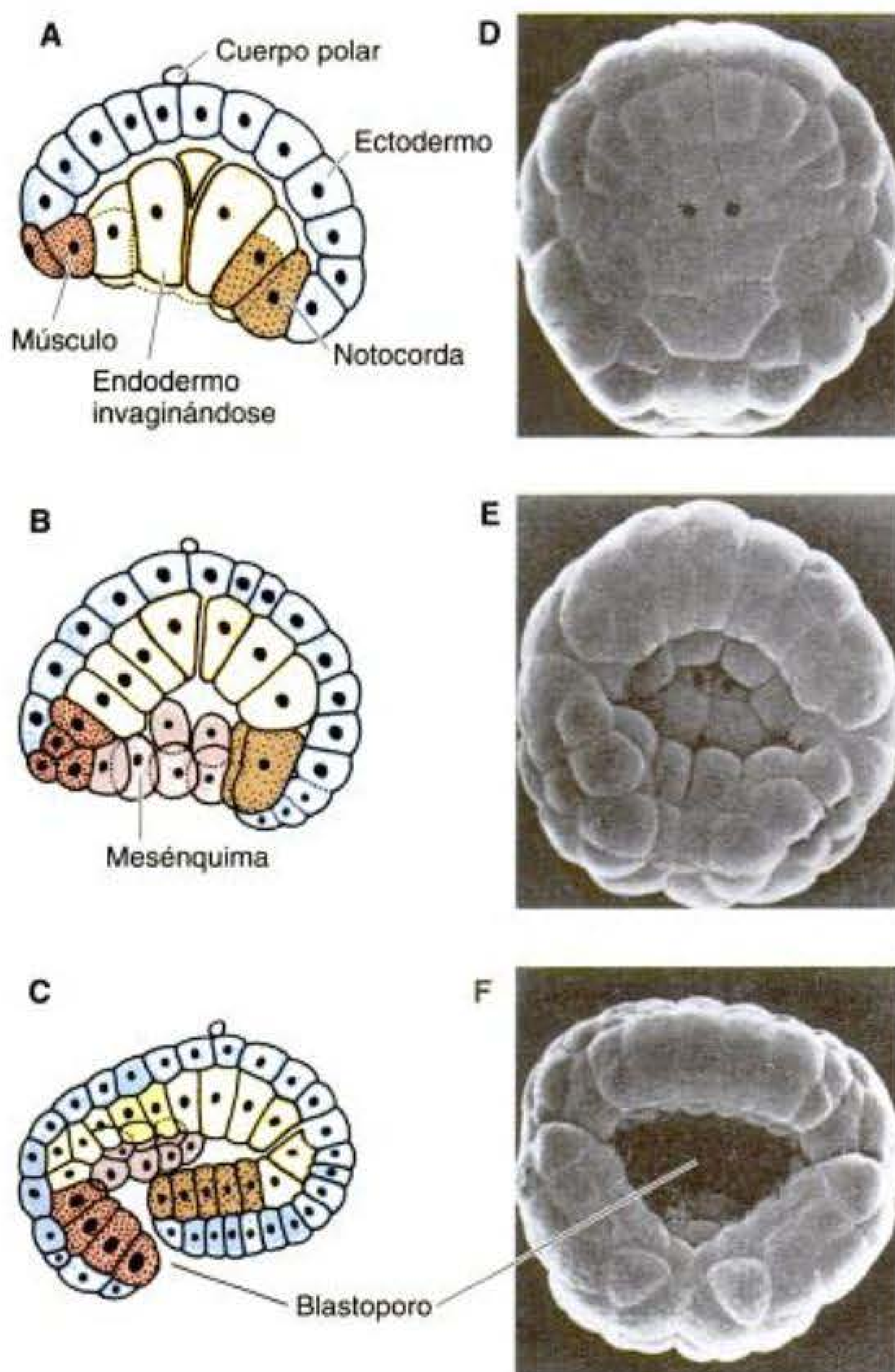


Fig. 8-42. Gastrulación en el tunicado. Secciones transversales (A–C) y microfotografías electrónicas de barrido vistas desde el polo vegetal (D–E) que ilustran la invaginación del endodermo (A, D), la involución del mesodermo (B, E) y la epibolia del ectodermo (C, F). Los destinos celulares tienen código de color como en la figura 8-36. (De Satoh 1978 y Jeffery y Swalla 1997; fotografías cortesía de N. Satoh.)

Gastrulación en los tunicados

Los tunicados, como los erizos de mar, siguen el patrón de la gastrulación de los deuterostomas, en los que el blastoporo se convertirá finalmente en el ano. La gastrulación de los tunicados está caracterizada por la invaginación del endodermo, la involución del mesodermo y la epibolia del ectodermo. Cerca de 4-5 horas después de la fecundación, las células vegetales (endodermo) adquieren una forma de cuña, expandiendo sus márgenes apicales y contrayéndose cerca de sus márgenes vegetales (fig. 8-42). Los pares de blastómeras A8.1 y B8.1 parecen conducir a esta invaginación en el centro del embrión. La invaginación forma un blastoporo cuyos labios llegarán a ser las células mesodérmicas. Las células de la notocorda presuntiva están ahora sobre la porción anterior del labio del blastoporo, mientras que las células musculares presuntivas de la cola (a partir de la medialuna amarilla) están sobre el labio posterior. Los labios laterales comprenden las células que llegarán a convertirse en mesénquima.

El segundo paso de la gastrulación involucra la involución del mesodermo. Las células del presunto mesodermo involucionan sobre los labios del blastoporo y por migración sobre la superficie basal de las células ectodérmicas, moviéndose dentro del embrión. Las células ectodérmicas luego se aplanan y epibolizan sobre el mesodermo y el endodermo, cubriendo finalmente el embrión. Después de completada la gastrulación, el embrión se alarga a lo largo de su eje anteroposterior. Las células del ectodermo dorsal que son las precursoras del tubo neural se invaginan en el embrión y son incluidas por los pliegues neurales. Este proceso forma el tubo neural, que formará hacia el extremo anterior un cerebro y hacia el extremo posterior una médula espinal. Mientras tanto, las células de la notocorda presunta sobre los lados derecho e izquierdo del embrión migran hacia la línea media y se interdigitan para formar la notocorda, una hilera única de 40 células. Las células musculares de la cola se diferencian a cada lado del tubo neural y de la notocorda (Jeffery y Swalla 1997). Un renacuajo está ahora formado y buscará un sustrato sobre el que establecerse y metamorfosearse en un tunicado adulto.

DESARROLLO TEMPRANO DEL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS

¿Por qué C. elegans*?*

Nuestra capacidad para analizar el desarrollo necesita organismos apropiados. Los erizos de mar han sido durante mucho tiempo el organismo preferido de los embriólogos debido a que sus gametos se pueden obtener fácilmente en grandes números, sus cigotos y embriones son transparentes, y la fecundación y el desarrollo se pueden producir bajo condiciones de laboratorio. Pero los erizos de mar son difíciles de criar por más de una generación en laboratorio, haciendo difícil el estudio de su genética. Los genetistas (al menos los que trabajan con eucariotas multicelulares) han favorecido siempre a *Drosophila*. Su rápido ciclo celular, su prontitud para reproducirse y los cromosomas politénicos de la larva (que permiten la localización de genes) hacen a la mosca de la fruta magníficamente conveniente para el análisis hereditario. Pero el desarrollo de *Drosophila* es complejo y difícil de estudiar.

Un programa de investigación encabezado por Sydney Brenner (1974) fue creado para identificar un organismo mediante el cual pudiera ser posible en éste identificar cada gen involucrado en el desarrollo así como trazar el linaje de cada una de las células. Los nematodos parecieron un buen lugar para empezar, debido a que embriólogos como Goldschmidt y Boveri habían demostrado que varias especies tenían un número relativamente pequeño de cromosomas y un número pequeño de células con linajes constantes. Finalmente, Brenner y col. se asentaron sobre *Caenorhabditis elegans*, un nematodo pequeño (1 mm de longitud), terrestre, de vida libre (fig. 8-43A). Tiene un rápido período de embriogénesis (cerca de 16 horas), que se puede llevar a cabo en una placa

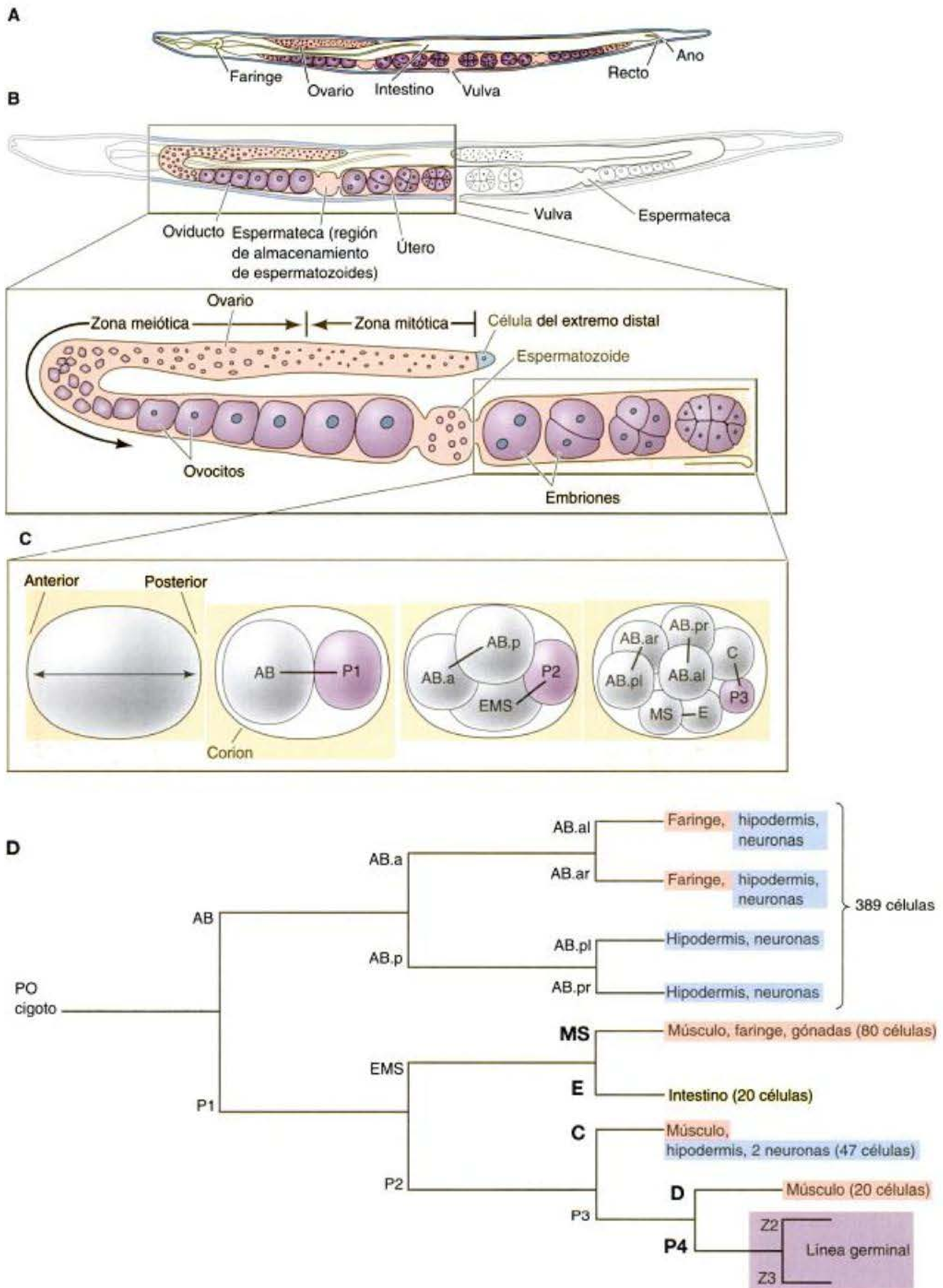


Fig. 8-43. *Caenorhabditis elegans.* **A.** Vista de lado del hermafrodita adulto. Los espermatozoides son almacenados de modo tal que un gameto femenino maduro pasa a través de los espermatozoides en su camino hacia la vulva. **B.** Gónadas. Cerca del extremo distal, las células germinales experimentan mitosis. A medida que se mueven alejándose del extremo distal entran en meiosis. Las meiosis tempranas forman espermatozoides, que son almacenados en la espermateca. Las meiosis tardías forman gametos femeninos, que son fecundados cuando ruedan a través de la espermateca. **C.** Desarrollo temprano, cuando el gameto femenino es fecundado y se mueve hacia la vulva. El linaje-P consiste en células madre que formarán finalmente las células germinales. **D.** Gráfico abreviado de linaje celular. La línea germinal se segrega en la porción posterior de la célula más posterior (P). Las primeras tres divisiones celulares producen los linajes AB, C, MS y E. El número de células derivadas (en paréntesis) se refiere a las 558 células presentes en la larva recién nacida. Algunas de éstas continúan dividiéndose para producir las 959 células somáticas del adulto. (Según Pines 1992, basado en Sulston y Horvitz 1977 y Sulston y col. 1983.)

de Petri y posee relativamente pocos tipos celulares. Además, su forma adulta predominante es hermafrodita, con cada individuo produciendo gametos femeninos y espermatozoides. Estos gusanos cilíndricos pueden reproducirse por autofecundación o por fecundación cruzada mediante la producción de apareamientos poco frecuentes. El cuerpo de un *C. elegans* adulto hermafrodita contiene exactamente 959 células somáticas, cuyo linaje total ha sido trazado a través de su cutícula transparente (fig. 8-43B; Sulston y Horvitz 1977; Kimble y Hirsh 1979; Sulston y col. 1983). Además, a diferencia de los linajes celulares de vertebrados, el linaje celular de *C. elegans* es casi totalmente constante de un individuo al siguiente. Hay poco espacio para la aleatoriedad (Sulston y col. 1983). *C. elegans* también tiene un pequeño número de genes para ser un organismo multicelular –cerca de 17.500– y su genoma ha sido totalmente secuenciado (la primera secuencia completa alguna vez obtenida para un organismo multicelular; *C. elegans* Sequencing Consortium 1999).

Segmentación y formación de ejes en C. elegans

Segmentación rotacional del cigoto de C. elegans

El cigoto de *C. elegans* presenta **segmentación holoblástica rotacional** (fig. 8-43C,D). Durante la segmentación temprana, cada división asimétrica produce una **célula fundadora** (indicadas como AB, MS, E, C y D), que produce descendientes diferenciados, y una **célula madre** (el linaje P1-P4). En la primera división celular, el surco de segmentación está localizado asimétricamente a lo largo de eje anteroposterior del cigoto, y más cerca de lo que será el polo posterior. Esta división forma una célula fundadora anterior (AB) y una célula madre posterior (P1). Durante la segunda división, la célula fundadora (AB) se divide ecuatorialmente (de manera longitudinal; 90º al eje anteroposterior), mientras que la célula P1 se divide meridionalmente (de manera transversal) para producir otra célula fundadora (EMS) y una célula madre posterior (P2). El linaje de célula madre siempre experimenta divisiones meridionales para producir 1) una célula fundadora anterior y 2) una célula posterior que continuará el linaje de célula madre.

Los descendientes de cada célula fundadora pueden ser observados a través de la cutícula transparente. Se dividen en momentos específicos de un modo tal que son casi idénticos de un individuo a otro. De esta forma se generan las exactamente 558 células de la larva recién nacida. Las células descendientes son denominadas según sus posiciones relativas a sus células hermanas. Por ejemplo, ABal es la célula hija "izquierda" de la célula ABa y ABa es la célula hija "anterior" de la célula AB.

Formación del eje anteroposterior

El eje alargado del cigoto de *C. elegans* define el futuro eje anteroposterior del cuerpo del nematodo. La decisión en cuanto a cuál extremo llegará a ser el anterior y cuál el posterior parece estar en relación con la posición del pronúcleo del espermatozoide. Cuando éste entra en el citoplasma del ovocito, el centríolo asociado con el pronúcleo del espermatozoide inicia movimientos citoplasmáticos que empujan al pronúcleo masculino al extremo más cercano del ovocito alargado. El extremo se convierte en el polo posterior (Goldstein y Hird 1996). El centríolo del espermatozoide continúa organizando los microtúbulos en el cigoto y estos microtúbulos permiten la colocación de varias proteínas maternas en el futuro extremo anterior y en el futuro extremo posterior del cigoto. PAR-2 llega a localizarse en el citoplasma cortical del polo próximo al núcleo del espermatozoide. Contrariamente, PAR-3 se localiza en el citoplasma cortical del extremo opuesto (el futuro extremo anterior). La colocación de estas dos proteínas asegura que una tercera proteína, PAR-1, será localizada en el futuro polo posterior. Las proteínas PAR fueron descubiertas mediante el análisis de mutantes que eran defectuosos en su división citoplasmática (en inglés, *par*titioning: nótese el origen del nombre PAR). Estas proteínas funcionan juntas para alinear apropiadamente el huso mitótico y separar los factores de transcripción maternos a sus células apropiadas (Kemphues y col. 1988; Kirby y col. 1990; Bowerman 1999; Wallenfang y Seydoux 2000).

Algunas de las entidades más importantes localizadas por las proteínas PAR son los **gránulos-P**, complejos de ribonucleoproteínas que especifican a las células germinales. Los gránulos P parecen ser una colección de reguladores de la traducción. Las proteínas de estos gránulos incluyen las RNA helicasas, las poli(A) polimerasas y los factores de iniciación de la traducción (Amiri y col. 2001; Smith y col. 2002; Wang y col. 2002).

Utilizando anticuerpos fluorescentes para un componente de los gránulos-P, Strome y Wood (1983) descubrieron que poco después de la fecundación, los gránulos-P se dispersan azarosamente moviéndose hacia el extremo posterior del cigoto, de modo tal que entran solamente en la blastómera (P1) formada a partir del citoplasma posterior (fig. 8-44). Los gránulos-P de la célula P1 se mantienen en la región posterior de la célula P1 cuando ésta se divide y de este modo son pasados a la célula P2. Sin embargo, durante la división de P2 y P3, los gránulos se asocian con el núcleo que ingresa en el citoplasma de P3. Finalmente, los gránulos-P residirán en la célula P4, cuyas progenies llegarán a ser el espermatozoide y el gameto femenino del adulto. La localización de los gránulos-P requiere microfilamentos, pero se puede producir ante la ausencia de microtúbulos. Tratando al cigoto con citocalasina D (un inhibidor de microfilamentos) se evita la segregación de estos gránulos al extremo posterior de la célula, mientras que demecolcina (un inhibidor de microtúbulos como la colchicina) no puede detener este movimiento.

SITIO WEB 8.6 **Migración de los gránulos-P (P-granule migration).** En el laboratorio de Susan Strome se hicieron películas sobre la migración de los gránulos-P bajo condiciones naturales y experimentales. Ellas muestran la segregación de los gránulos-P a las blastómeras del linaje-P excepto cuando fueron alteradas por mutaciones o químicos que inhiben la función de los microfilamentos.

SITIO WEB 8.7 **Las proteínas PAR (The PAR proteins).** La polaridad de las divisiones celulares y la distribución de los determinantes morfogenéticos son especificadas por las posiciones de las proteínas PAR. Estas proteínas son críticas en coordinar la división celular y la localización citoplasmática.

Formación de los ejes dorsoventral y derecha-izquierda

El eje dorsoventral del nematodo se observa en la división de la célula AB. Cuando la célula AB se divide, llega a ser más larga que el ancho de la cáscara del huevo. Esto hace que las células se deslicen, causando que una de las células hijas AB sea anterior y otra sea posterior (de ahí sus nombres, ABa y ABp, respectivamente; véase fig. 8-46). Esta compresión también hace que la célula ABp tome una posición por arriba de la célula EMS que resulta de la división de la blastómera P1. La célula ABp define el futuro lado dorsal del embrión, mientras que la célula EMS, la precursora de células musculares y del intestino, marca la futura superficie ventral del embrión. El eje izquierda-derecha es especificado más tarde, en el estadio de 12 células, cuando la blastómera MS (de la división de la célula EMS) contacta con la mitad de las "nietas" de la célula ABa, distinguiendo el lado derecho del cuerpo del izquierdo (Evans y col. 1994).

Control de la identidad de la blastómera

C. elegans demuestra modos de especificación celular condicional y autónoma. Ambos modos pueden verse si las primeras dos blastómeras son separadas experimentalmente (Priess y Thomson 1987). La célula P1 se desarrolla autónomamente sin la presencia de AB. Ésta produce todas las células que haría normalmente y el resultado es la mitad posterior de un embrión. Sin embargo, la célula AB, en aislamiento, produce solo una fracción de los tipos celulares que haría normalmente. Por ejemplo, la blastómera ABa resultante no puede producir los músculos faríngeos anteriores que habría producido en un embrión normal. Por lo tanto, la especificación de la blastómera AB es condicional, y es necesario que los descendientes de la célula P1 interactúen con ésta.

ESPECIFICACIÓN AUTÓNOMA. La determinación de los linajes de P1 parece ser autónoma, con los destinos celulares de-

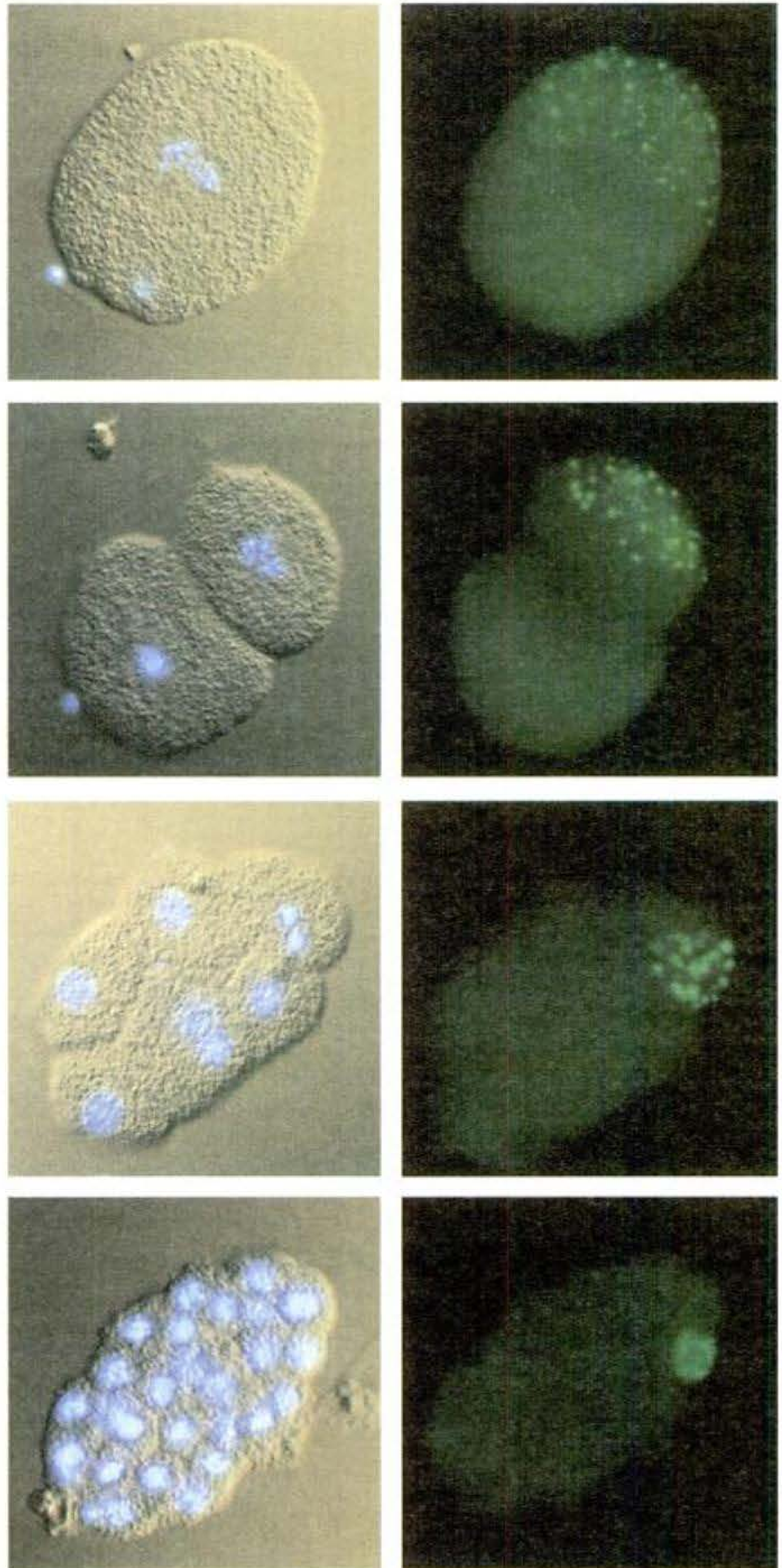


Fig. 8-44. Segregación de los gránulos-P en el linaje de la línea germinal del embrión de *C. elegans*. La columna de la izquierda muestra los núcleos celulares (el DNA está teñido de azul por la tinción de Hoescht), mientras que la columna derecha muestra los mismos embriones teñidos para los gránulos-P. En cada división sucesiva, los gránulos-P entran en la blastómera de linaje-P, la que formará las células germinales. (Fotografías cortesía de S. Strome.)

terminados por factores citoplasmáticos internos en lugar de interacciones con células vecinas. Los gránulos-P de *C. elegans* están localizados en un modo consistente con una función como determinantes morfogenéticos y actúan a través de la regulación de la traducción (el mecanismo exacto no es bien entendido) para especificar a las células germinales. Mientras tanto, se piensa que las proteínas SKN-1, PAL-1 y PIE-1 codifican factores de transcripción que actúan intrínsecamente para determinar los destinos de las células derivadas de las cuatro células fundadoras somáticas derivadas de P1, MS, E, C y D.

La proteína **SKN-1** es un polipéptido expresado maternamente que puede controlar el destino de la blastómera EMS, la célula que genera la faringe posterior. Después de la primera segmentación, solo la blastómera posterior, P1, tiene la capacidad de producir autónomamente células faríngeas cuando es aislada. Después que P1 se divide, solo EMS es capaz de generar en aislamiento células musculares faríngeas (Priess y Thomson 1987). Del mismo modo, cuando las células EMS se dividen, solo una de esta progenie, MS, tiene la capacidad intrínseca para generar tejido faríngeo. Este hallazgo sugiere que el destino celular faríngeo puede ser determinado autónomamente por factores maternos que residen en el citoplasma que dividen a estas células particulares. Bowerman y col. (1992a,b, 1993) hallaron efectos maternos en los mutantes que carecían de células faríngeas y fueron capaces de aislar una mutación en el gen *skn-1*. Los embriones de homocigotas de madres deficientes de *skn-1* carecen de mesodermo faríngeo y de derivados endodérmicos de la EMS (fig. 8-45). En lugar de producir las estructuras faríngeas e intestinales normales, estos embriones parecían producir tejidos hipodérmico (piel) y de la pared corporal extra donde deberían estar su intestino y faringe. En otras palabras, EMS parece ser reespecificada como C. Solo las células destinadas a formar faringe o intestino están afectadas por esta mutación. Además, la proteína codificada por el gen *skn-1* tiene un sitio de unión al DNA similar al visto en la familia bZip de los factores de transcripción (Blackwell y col. 1994).

SKN-1 es una proteína materna, y activa a los factores de transcripción de al menos dos genes, *med-1* y *med-2*, cuyos productos son también factores de transcripción. Los factores de transcripción MED parecen especificar el destino total de la célula EMS, debido a que la expresión de los genes *med* en otras células puede causar que células que no son EMS lleguen a ser EMS aun si SKN-1 está ausente (Maduro y col. 2001).

Un segundo supuesto factor de transcripción, **PAL-1**, también es requerido para la diferenciación del linaje de P1. La actividad de PAL-1 es necesaria para el desarrollo normal de los descendientes somáticos de la blastómera P2. Por lo tanto, los embriones carentes de PAL-1 no tienen tipos celulares somáticos derivados de las células madre C y D (Hunter y Kenyon 1996). PAL-1 es regulado por la proteína MEX-3, una proteína que se une al RNA que parece inhibir la traducción del mRNA de *pal-1*. Dondequiera que *mex-3* es expresado, PAL-1 está ausente. Por lo tanto, en los mutantes deficientes de *mex-3*, PAL-1 es visto en cada blastómera. SKN-1 también inhibe a PAL-1 (de ese modo impide que llegue a ser activo en las células EMS).

Un supuesto tercer factor de transcripción, **PIE-1**, es necesario para el destino de la línea germinal. PIE-1 es colocado en las blastómeras P mediante la acción de la proteína PAR-1, y parece inhibir la función de SKN-1 y PAL-1 en las células de P2 y en las células ulteriores de la línea germinal (Hunter y Kenyon 1996). Las mutaciones del gen materno *pie-1* resultan en la adopción de destinos somáticos por parte de las blastómeras de la línea germinal, con la célula P2 comportándose del mismo modo que una blastómera EMS tipo salvaje. La localización y las propiedades genéticas de PIE-1 sugieren que ésta reprime el establecimiento del destino celular somático y preserva la totipotencialidad del linaje celular germinal (Mello y col. 1996; Seydoux y col. 1996).

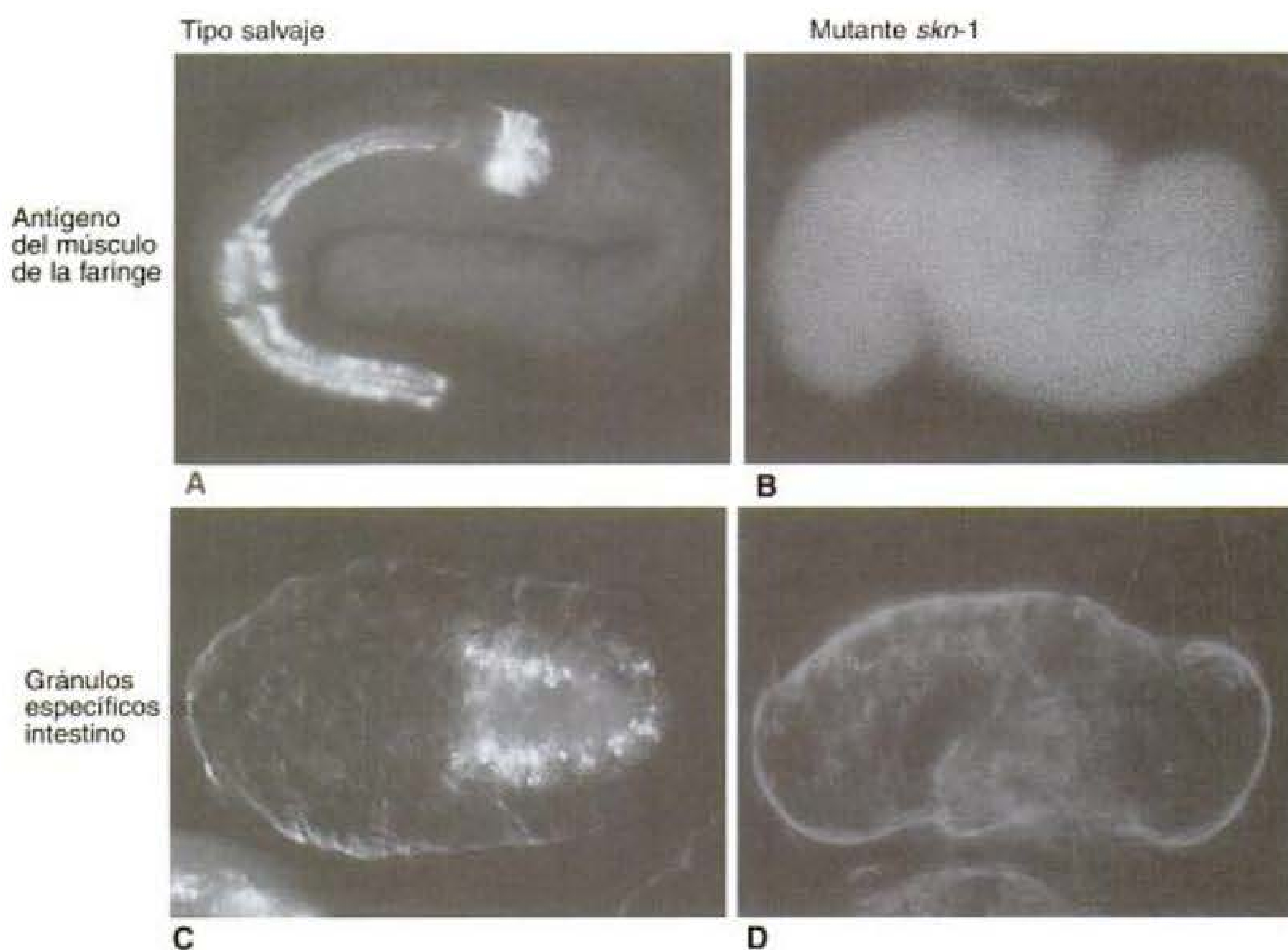


Fig. 8-45. Deficiencias de intestino y faringe en los mutantes *skn-1* de *C. elegans*. Los embriones derivados de las hembras tipo salvaje **(A, C)** y de las hembras homocigotas para el mutante *skn-1* **(B, D)** fueron analizados para la presencia de músculos faríngeos **(A, B)** y gránulos específicos de intestino **(C, D)**. Un anticuerpo específico de músculo faríngeo marca la musculatura de la faringe de los embriones derivados de las hembras tipo salvaje **(A)**, pero no se une a ninguna estructura en los embriones de hembras mutantes de *skn-1* **(B)**. Del mismo modo, los gránulos birrefringentes característicos de intestinos embrionarios **(C)** están ausentes en los embriones derivados de las hembras mutantes de *skn-1* **(D)**. (De Bowerman y col. 1992a; fotografías cortesía de B. Bowerman.)

SITIO WEB 8.8 Mecanismos de localización citoplasmática en *C. elegans* (Mechanisms of cytoplasmic localization in *C. elegans*). Los análisis de las mutaciones de *C. elegans* han aislado genes cuyos productos proteicos son esenciales en la especificación del destino celular. En algunos ejemplos, estas proteínas están involucradas en la colocación de los determinantes morfogenéticos.

ESPECIFICACIÓN CONDICIONAL. Como se vio antes, el embrión de *C. elegans* utiliza modos de especificación autónomo y condicional. La especificación condicional puede verse en el desarrollo del linaje celular endodérmico. En el estadio de 4 células, la célula EMS requiere una señal de su vecina (y hermana), la blastómera P2. En general, la célula EMS se divide en una célula MS (que produce músculo mesodérmico) y una célula E (que produce endodermo del intestino). Si la célula P2 es quitada en el estadio temprano de 4 células, la célula EMS se dividirá en dos células MS y no se producirá endodermo. Sin embargo, si la célula EMS es recombinada con la blastómera P2 ésta formará endodermo; no obstante, no lo hará cuando esté combinada con ABa, ABp o ambos derivados AB (fig. 8-46; Goldstein 1992).

La célula P2 produce una señal que interactúa con la célula EMS e instruye a la EMS hija que está próxima a ésta a convertirse en célula E. Este mensaje es transmitido a través de la cascada de señalización de Wnt (fig. 8-47; Rocheleau y col. 1997; Thorpe y col. 1997). La célula P2 produce una proteína de *C. elegans* homóloga de la proteína Wnt, el péptido MOM-2. El péptido MOM-2 es recibido en la célula EMS por la proteína MOM-5, una versión de *C. elegans* de la proteína Frizzled receptora de Wnt. El resultado de esta cascada de señalización es la regulación en menos de la expresión del gen *pop-1* en la EMS hija destina a convertirse en la célula E. En los embriones deficientes de *pop-1*, ambas células EMS hijas se convierten en célula E (Lin y col. 1995).

La célula P2 es también crítica en dar la señal que distingue a ABp de su hermana, ABa (véase fig. 8-47). ABa da origen a neuronas, hipodermis y células de la faringe anterior, mientras que ABp produce solo neuronas y células hipodérmicas. Sin embargo, si experimentalmente se invierten las posiciones de estas dos células, sus destinos son invertidos del mismo modo, y se forma un embrión normal. En otras palabras, ABa y ABp son células equivalentes cuyos destinos están determinados por sus posiciones dentro del embrión (Priess y Thomson 1987). Los estudios de trasplantes y los genéticos han mostrado que ABp llega a ser diferente de ABa a través de su interacción con la célula P2. En un embrión sin perturbaciones, ABa y ABp contactan con la blastómera EMS, pero solo ABp contacta con la célula P2. Si la célula P2 es matada en el estadio temprano de 4 células, la célula ABp no genera su complemento normal de células (Bowerman y col. 1992a,b). El contacto entre ABp y P2 es esencial para la especificación de los destinos celulares de ABp, y la célula ABa puede ser transformada en una célula tipo ABp si es forzada a contactar con P2 (Hutter y Schnabel 1994; Mello y col. 1994).

Esta interacción es mediada por la proteína GLP-1 sobre la célula ABp y la proteína APX-1 (exceso anterior de la faringe- del inglés, *anterior pharynx excess*) sobre la blastómera P2. En embriones cuyas madres tienen mutantes de *glp-1*, ABp es transformada en una célula ABa (Hutter y Schnabel 1994; Mello y col. 1994). La proteína GLP-1 es un miembro de una familia ampliamente conservada denominada las proteínas Notch, que sirven como receptores de membrana celular en muchas interacciones célula-célula, y son vistas sobre las células ABa

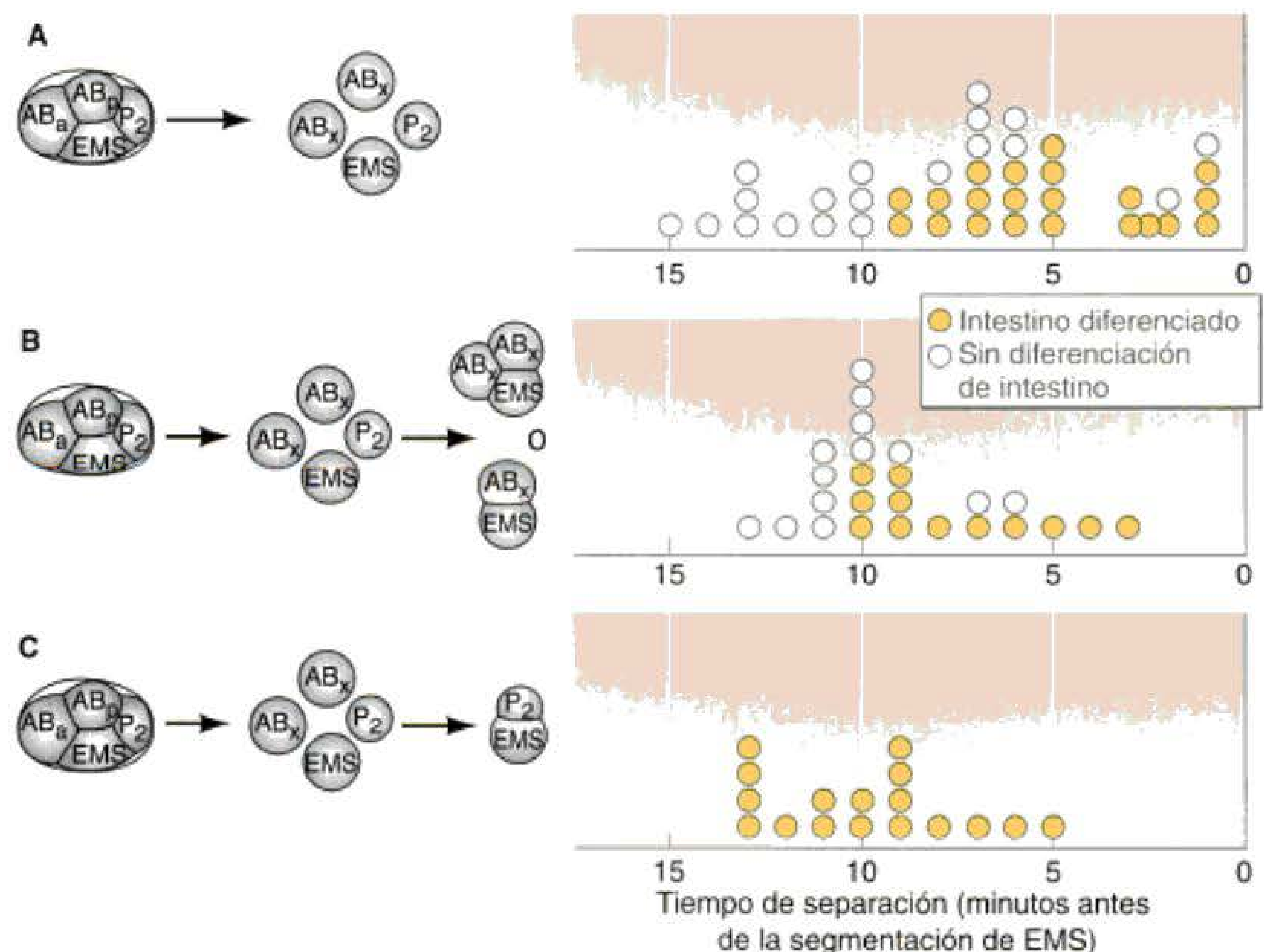


Fig. 8-46. Los experimentos de aislamiento y recombinación muestran que las interacciones célula-célula son requeridas para que la célula EMS forme determinantes de linaje intestinal. **A.** Cuando la blastómera EMS es aislada poco después de su formación, no puede producir gránulos específicos de intestino. Si se la deja en su lugar por períodos más largos, lo puede hacer. **B.** Si la célula EMS es recombinada de nuevo con uno o ambos derivados de la blastómera AB, ésta no formará gránulos específicos de intestino. **C.** Si es recombinada con la blastómera P2, la célula EMS dará origen a estructuras específicas del intestino. (Según Goldstein 1992.)

Fig. 8-47. Señalización célula-célula en el embrión de 4 células de *C. elegans*. La célula P2 produce dos señales: (1) la proteína yuxtacrina APX-1 (Delta), que es unida por GLP-1 (Notch) sobre la célula Abp, y 2) la proteína paracrina MOM-2 (Wat) que es unida por la proteína MOM-5 (Frizzled) sobre la célula EMS (Según Han 1998.)

y ABp (Evans y col. 1994).* Como se mencionó en el capítulo 5, uno de los ligandos más importantes de las proteínas Notch como las GLP-1 es otra proteína de superficie celular denominada Delta. En *C. elegans*, la proteína tipo Delta es APX-1, y ésta se encuentra sobre la célula P2 (Mango y col. 1994a; Mello y col. 1994). Esta señal APX-1 rompe la simetría entre ABa y ABp, ya que estimula a la proteína GLP-1 únicamente sobre el descendiente AB que ésta toca –denominada, la blastómera ABp. Al hacerlo, la célula P2 inicia el eje dorsoventral de *C. elegans* y le otorga a la blastómera ABp un destino diferente del de su célula hermana.

Integración de la especificación autónoma y condicional: diferenciación de la faringe de C. elegans

En la discusión anterior, debería hacerse evidente que la faringe es generada por dos grupos de células. Un grupo de precursores faríngeos proviene de la célula EMS y es dependiente del gen materno *skn-1*. El segundo grupo de precursores faríngeos viene de la blastómera ABa y es dependiente de la señalización de GLP-1 a partir de la célula EMS. En ambos casos, las células precursoras faríngeas (y solo estas células) son instruidas a activar el gen *pha-4* (Mango y col. 1994b). Este gen codifica un factor de transcripción que se asemeja a la proteína HNF-3β de mamífero. Utilizando micromatrices para determinar los blancos de interés de esta proteína, Gaudet y Mango (2002) encontraron que el factor de transcripción PHA-4 activa a casi todos los genes específicos de la faringe. Parece que el factor de transcripción PHA-4 puede ser el nodo que toma los aportes maternos y los transforma en una señal que transcribe a los genes cigóticos necesarios para el desarrollo de la faringe.

Gastrulación en C. elegans

La gastrulación en *C. elegans* comienza extremadamente temprano, justo después de la generación de la célula P4 en el embrión de 24 células (Skiba y Schierenberg 1992). En este momento, las dos hijas de la célula E (Ea y Ep) migran desde el lado ventral hacia el centro del embrión. Allí se dividirán para formar un intestino que consiste en 20 células. Hay un blastocele muy pequeño y transitorio previo al movimiento de las células Ea y Ep y su movimiento hacia adentro crea un minúsculo blastoporo. La siguiente célula que migra a través de este blastoporo es la célula P4, la precursora de las células germinales. Ésta migra a una posición por debajo del primordio del intestino. Las células del mesodermo se mueven a continuación: los descendientes de la célula MS migran hacia

Fig. 8-48. Gastrulación en *C. elegans*. **A.** Posiciones de las células fundadoras y sus descendientes en el estadio de 26 células, justo previo a la gastrulación. **B.** Estadio de 102 células, después de la migración de los descendientes de E, P4 y D. **C.** Posiciones de las células cerca del final de la gastrulación. Las líneas punteada y entrecortada representan regiones de la hipodermis contribuidas por AB y C, respectivamente. **D.** Gastrulación temprana, cuando las dos células E comienzan a moverse hacia adentro. (Según Schierenberg 1998; fotografía cortesía de E. Schierenberg.)

* La proteína GLP-1 está localizada en las blastómeras ABa y ABp, pero el mRNA *glp-1* codificado maternamente es hallado a lo largo de todo el embrión. Evans y colegas (1994) han postulado que podría haber algún determinante traduccional en la blastómera AB que le permite al mensajero glp-1 ser traducido en sus descendientes. El gen *glp-1* es también activo en la regulación posembrionaria de las interacciones celulares. Éste es utilizado más tarde por la célula del extremo distal de la gónada para controlar el número de células germinales que entran en meiosis; de ahí el mismo nombre de GLP, "proliferación de la línea germinal" (del inglés, *germ line proliferation*).

adentro desde el lado anterior del blastoporo y los precursores musculares derivados de D y de C entran desde el lado posterior. Estas células flanquean al tubo digestivo sobre los lados izquierdo y derecho (fig. 8-48; Schierenberg 1997). Por último, cerca de 6 horas después de la fecundación, las células derivadas de AB que contribuyen a la faringe son llevadas hacia adentro, mientras que las células del hipoblasto (precursores hipodérmicos) se mueven ventralmente por epibolia, cerrando finalmente el blastoporo. Los dos lados de la hipodermis son sellados por caderina E sobre los extremos de las células principales que se encuentran en la línea media ventral (Raich y col. 1999). Durante las 6 horas siguientes, las células se mueven y desarrollan órganos, mientras que los embriones con forma de esfera se alargan para convertirse en gusano (véase Priess y Hirsh 1986; Schierenberg 1997). Este gusano hermafrodita tendrá 558 células somáticas. Unas 115 células adicionales serán formadas, pero experimentarán apoptosis (véase cap. 6). Después de cuatro mudas, este gusano será un adulto maduro sexualmente, que contiene 959 células somáticas, así como numerosos espermatozoides y gametos femeninos.

El programa de investigación en *C. elegans* fue diseñado para integrar genética y embriología para proporcionar un entendimiento de las redes que gobiernan la diferenciación celular y la morfogénesis. Además de darnos algunas perspectivas destacables de cómo la expresión del gen puede cambiar durante el desarrollo, los estudios de *C. elegans* también nos han humillado demostrando cuán complejas son estas redes. ¡Incluso en un organismo tan "simple" como *C. elegans*, con solo unos cientos de genes y tipos celulares, el lado derecho del cuerpo es producido de un modo diferente del izquierdo! La identificación de los genes mencionada antes es solo el comienzo del esfuerzo para entender la compleja interacción de los sistemas de desarrollo.

Cierre

Este capítulo describió el desarrollo embrionario temprano en cuatro especies de invertebrados, en la que cada una de ellas se desarrolla en un patrón diferente. Sin embargo, el grupo más grande de animales sobre este planeta es otro grupo de invertebrados: los insectos. Probablemente se conozca más sobre el desarrollo de un insecto particular, *Drosophila melanogaster*, que de cualquier otro organismo. El siguiente capítulo detalla el desarrollo temprano de esta criatura particularmente bien estudiada.

Resumen: desarrollo temprano de los invertebrados

1. Durante la segmentación, la mayoría de las células no crecen. En su lugar, el volumen del ovocito es segmentado en numerosas células. Las principales excepciones a esta regla son los mamíferos.
2. El vocabulario "Blast": Una *blastómera* es una célula derivada de la segmentación en un embrión temprano. Una *blástula* es una estructura embrionaria compuesta de blastómeras. La cavidad dentro de la blástula es el *blastocele*. Si la blástula carece de blastocele, es una *estereoblástula*. (Una blástula de mamíferos es denominada un *blastocisto*, véase cap. 11.) La invaginación por donde comienza la gastrulación es el *blastoporo*.
3. El ciclo celular de la blastómera es gobernado por la síntesis y degradación de la ciclina B. La síntesis de ciclina B promueve la formación del factor promotor de la mitosis, y el FPM promueve la mitosis. La degradación de la ciclina B devuelve la célula a la fase S. Las fases G son agregadas en la transición de blástula media.
4. Los movimientos de la gastrulación incluyen invaginación, involución, ingresión, delaminación y epibolia.
5. Tres ejes forman los cimientos del cuerpo: el eje anteroposterior (cabeza a cola o boca a ano), el eje dorsoventral (espalda a vientre), y el eje derecha-izquierda (entre los dos lados laterales del cuerpo).
6. Los ejes corporales son establecidos de diferentes modos en las distintas especies. En algunas, como el erizo de mar y los tunicados, los ejes son establecidos en la fecundación a través de determinantes presentes ya en el citoplasma del gameto femenino. En otras, como los nematodos y el caracol, los ejes son establecidos mediante las interacciones celulares tardías en el desarrollo.
7. En los cuatro invertebrados descritos en este capítulo, la segmentación es holoblástica. En el erizo de mar, la segmentación es radial; en el caracol, espiral; en el tunicado, bilateral y en el nematodo, rotacional.
8. En el erizo de mar, la gastrulación se produce solo después que cientos de células son formadas y el blastoporo se convierte en el ano. Este es el modo de gastrulación de los deuterostomas, y es característico de los equinodermos, tunicados y cordados (incluidos vertebrados).
9. En el erizo de mar, los destinos celulares son determinados por la señalización célula-célula. Las micrómeras constituyen el principal centro señalizador. La β-catenina nuclear es importante para la capacidad inductiva de las micrómeras.
10. La adhesión celular diferencial es importante en la regulación de la gastrulación del erizo de mar. Las micrómeras se separan primero de la placa vegetal y se mueven dentro del blastocele. Ellas forman el mesénquima primario, que llegará a formar las varillas esqueléticas de la larva plútea. La placa vegetal se invagina para formar el arquenterón endodérmico, con una punta de células de mesénquima secundario. El arquenterón se alarga por extensión convergente y es guiado hacia la futura región de la boca por el mesénquima secundario.
11. Los caracoles presentan segmentación espiral y forman estereoblástulas sin blastoceles. La dirección de la segmentación espiral está regulada por un factor

codificado por la madre y colocado en el ovocito. La segmentación espiral puede ser modificada por la evolución, y las adaptaciones de la segmentación espiral han permitido a algunos moluscos sobrevivir en ambientes de otro modo muy severos.

12. El lóbulo polar de ciertos moluscos contiene los determinantes morfogenéticos para el mesodermo y el endodermo. Estos determinantes entran en la blastómera D.

13. En el caracol y el nematodo, la gastrulación se produce cuando hay relativamente pocas células, y el blastoporo se convierte en la boca. Éste es el modo de gastrulación de los protostomas. El tunicado, como el erizo de mar, es un deuterostoma; por lo tanto el blastoporo es posterior mientras que la boca es formada en otro sitio.

14. El mapa de destino de tunicado es idéntico sobre sus lados derecho e izquierdo. El citoplasma amarillo contiene determinantes formadores de músculo; éstos actúan autónomamente. El sistema nervioso de los tunicados es formado condicionalmente, mediante interacciones entre las blastómeras.

15. El nematodo terrestre *Caenorhabditis elegans* fue elegido como un organismo modelo debido a que tiene un número pequeño de células, tiene un pequeño genoma, es fácilmente criado y mantenido, tiene una vida útil corta, puede ser manipulado genéticamente y tiene una cutícula a través de la cual se pueden ver los movimientos celulares.

16. En las divisiones tempranas del cigoto de *C. elegans*, una célula hija se convierte en un célula fundadora (produciendo descendientes diferenciados) y la otra se convierte en una célula madre (produciendo otras células fundadoras y la línea germinal).

17. La identidad de la blastómera en *C. elegans* está regulada por especificación autónoma y la condicional.

Bibliografía citada

Amiri, A., B. D. Keiper, I. Kawasaki, Y. Fan, Y. Kohara, R. E. Rhoads and S. Strome. 2001. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in C. elegans. Development 128: 3899-3912.

Angerer, L. M., D. W. Oleksyn, A. M. Levine, X. Li, W. H. Klein and R. C. Angerer. 2001. Sea urchin goosecoid function links fate specification along the animal-vegetal and oral-aboral embryonic axes. Development 128: 4393-4404.

Armstrong, N., J. Hardin and D. R. McClay 1993. Cell-cell interactions regulate skeleton formation in the sea urchin embryo. Development 119: 833-840.

Atkinson, J. W. 1987. An atlas of light micrographs of normal and lobeless larvae of the marine gastropod Ilyanassa obsoleta. Int. J. Invert. Reprod. Dev. 9: 169-178.

Balinsky, B. I. 1981. Introduction to Embryology, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bates, W. R. and W. R. Jeffery. 1988. Polarization of ooplasmic segregation and dorsal-ventral axis determination in ascidian embryos. Dev. Biol. 130: 98-107.

Berg, L. K., S. W. Chen and G. M. Wessel. 1996. An extracellular matrix molecule that is selectively expressed during development is important for gastrulation in the sea urchin embryo. Development 122: 703-713.

Bisgrove, B. W., M. E. Andrews and R. A. Raff. 1991. Fibropellirs, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo. Dev. Biol. 146: 89-99.

Blackwell, T. K., B. Bowerman, J. R. Priess and H. Weintraub. 1994. Formation of a monomeric DNA binding domain by SKN bZIP and homeodomain elements. Science 266: 621-628.

Bonder, E. M., D. J. Fishkind, J. H. Henson, N. M. Cotran and D. A. Begg. 1988. Actin in cytokinesis: Formation of the contractile apparatus. Zool. Sci. 5: 699-701.

Boveri, T. 1901. Die Polaritat von Ovocyte, Ei, und Larve des Strongylocentrotus lividus. Zool. Jahrh Abt. Anat. Ontog. Tiere 14: 630-653.

Bowerman, B. 1999. Maternal control of polarity and patterning during embryogenesis in the nematode Caenorhabditis elegans. In S. A. Moody (ed.), Cell Lineage and Determination. Academic Press, New York, pp. 97-118.

Bowerman, B., B. A. Eaton and J. R. Priess. 1992a skn-1, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early C. elegans embryo. Cell 68: 1061-1075.

Bowerman, B., F. E. Tax, J. H. Thomas and J. R. Priess. 1992b. Cell interactions involved in the development of the bilaterally symmetrical intestinal valve cells during embryogenesis of Caenorhabditis elegans. Development 116: 1113-1122.

Bowerman, B., B. W. Draper, C. C. Mello and J. R. Priess. 1993. The maternal gene skn-1 encodes a protein that is distributed unequally in early C. elegans embryos. Cell 74: 443-452.

Boycott, A. E., C. Diver, S. L. Garstang and F. M. Turner. 1930. The inheritance of sinistrality in Limnaea peregra (Mollusca: Pulmonata). Phil. Trans. R. Soc. Lond. [B] 219: 51-131.

Brenner, S.1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77: 71-94.

Burke, R. D., R. L. Myers, T. L. Sexton and C. Jackson. 1991 Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 146: 542-558.

Cameron, R. A., S. E. Fraser, R. J. Britten and E. H. Davidson. 1989. The oral-aboral axis of a sea urchin embryo is specified by the first cleavage. Development 106: 641-647.

Cather, J. N. 1967. Cellular interactions in the development of the shell gland of the gastropod Ilyanassa. J. Exp. Zool. 166: 205-224.

C. elegans Sequencing Consortium. 1999. Genome sequence of the nematode C. elegans: A platform for investigating biology. Science 282: 2012-2018. www.sanger.ac.uk; genome.wustl. edu/gsc/gschmpg.html

Chabry, L. M. 1888. Contribution a l'embryologie normale tératologique des ascidies simples. J. Anat. Physiol. Norm. Pathol. 23: 167-321.

Cherr, G. N., R. G. Summers, J. D. Baldwin and J. B. Morrill. 1992. Preservation and visualization of the sea urchin blastocoelic extracellular matrix. Microsc. Res. Tech. 22:11-22.

Clement, A. C. 1962. Development of Ilyanassa following removal of the D micromere at successive cleavage stages. J. Exp. Zool. 149: 193-215.

Clement, A. C. 1967. The embryonic value of the micromeres in Ilyanassa obsoleta, as determined by deletion experiments. I. The first quartet cells.1. Exp. Zool. 166: 77-88.

Clement, A. C. 1968. Development of the vegetal half of the Ilyanassa egg after removal of most of the yolk by centrifugal force, compared with the development of animal halves of similar visible composition. Dev. Biol. 17: 165-186.

Clement, A. C. 1986. The embryonic value of the micromeres in Ilyanassa obsoleta, as determined by deletion experiments. III. The third quartet cells and the mesentoblast cell, 4d. Int. J. Invert. Reprod. Dev. 9: 155-168.

Collier, J. R. 1997. Gastropods, the snails. In S. F. Gilbert and A. Raunio (eds.), Emhryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 189-218.

Conklin, E. G. 1897. The embryology of Crepidula. J. Morphol. 13: 3-209.

Conklin, E. G. 1905. The orientation and cell-lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila. 13: 5-119.

Craig, M. M. and J. B. Morrill. 1986. Cellular arrangements and surface topography during early development in embryos of Ilyanassa obsoleta. Int. J. Invert. Reprod. Dev. 9: 209-228.

Crampton, H. E. 1894. Reversal of cleavage in a sinistral gastropod. Ann. NY Acad. Sci. 8: 167-170.

Crampton, H. E. 1896. Experimental studies on gastropod development. Arch. Entwicklunsmech. 3: 1-19.

Dan, K. 1960. Cytoembryology of echinoderms and amphibia. Int. Rev. Cytol. 9: 321-368.

Dan, K. and K. Okazaki. 1956. Cytoembryological studies of sea urchins. III. Role of secondary mesenchyme cells in the formation of the primitive gut in sea urchin larvae. Biol. Bull.110: 29-42.

Danilchik, M. V., W. C. Funk, E. E. Brown and K. Larkin. 1998. Requirement for microtubules in new membrane formation during cytokinesis of Xenopus embryos. Dev. Biol. 194: 47-60.

Dan-Sohkawa, M. and H. Fujisawa. 1980. Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, Asterina pectinifera. Dev. Biol. 77: 328-339.

Darras, S. and H. Nishida. 2001. The BMP signaling pathway is required together with the FGF pathway for notochord induction in the ascidian embryo. Development 128(14): 2629-2638.

Davidson, E. H. 2001. Genomic Reglatory Systems. Academic Press, New York.

Davidson, E. H. and 24 others. 2002. A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 246: 162-190.

Di Gregorio, A., J. C. Corbo and M. Levine. 2001.The regulation of forkhead/HNF-3,B expression in the Ciona embryo. Dev. Biol. 229: 31-43.

Edgar, B., C. P. Kiehle and G. Schubiger. 1986. Cell cycle control by the nucleocytoplasmic ratio in early Drosophila development. Cell 44: 365-372.

Erives, A. and M. Levine.2000. Characterization of a maternal T-box gene in Ciona intestinalis. Dev. Biol. 225: 169-178.

Ettensohn, C. A. 1985. Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epitheial cells. Dev. Biol. 112: 383-390.

Ettensohn, C. A. 1990. The regulatian of primary mesenchyme cell patterning. Dev. Biol. 140: 261-271.

Ettensohn, C. A. and E. P. Ingersoll. 1992. Morphogenesis of the sea urchin embryo. In E. F. Rossomondo and S. Alexander (eds.), Morphogenesis. Marcel Dekker, New York, pp. 189-262.

Ettensohn, C. A. and D. R. McClay. 1986. The regulation of primary mesenchyme cell migration in the sea urchin embryo: Transplantations of cells and latex beads. Dev. Biol. 117: 380-391.

Ettensohn, C. A. and H. Sweet. Z000. Patterning of the early sea urchin embryo. Curr. Top. Dev. Biol. 50: 1-44.

Evans, T., E. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt.1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33: 389-396.

Evans, T. C., S. L. Crittenden, V. Kodoyianni and J. Kimble. 1994. Translational control of maternal glp-l mRNA establishes an asymmetry in the C. elegans embryo. Cell 77: 183-194.

Fink, R. D. and D. R. McClay. 1985. Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. Dev. Biol. 107: 66-74.

Freeman, G. and J. W. Lundelius. 1982. The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod Limnea peregra. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 191: 69-83.

Galileo, D. S. and I. B. Motrill. 1985. Patterns of cells and extracellular material of the sea urchin Lytechinus variegatus (Echinodermata; Echinoidea) embryo, from hatched blastula to late gastrula. J. Morphol. 185: 387-402.

Gaudet, J. and S. E. Mango. 2002. Regulation of organogenesis by the Caenorhabditis elegans FoxA protein PHA-4. Science 295: 821-825.

Gerhart, J. C., M. Wu and M. Kirschner. 1984. Cell dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in Xenopus laevis oocytes and eggs. J. Cell. Biol. 98: 1247-1255.

Goldstein, B. 1992. Induction of gut in Caenorhabditis elegans embryos. Nature 357: 255-258.

Goldstein, B and S. N. Hird. 1996. Specification of the anterioposterior axis in Caenorhabditis elegans. Development 122: 1467-1474.

Guerrier, P., J. A. M. van den Biggelaar, C. A. M. Dongen and N. H. Verdonk. 1978. Significance of the polar lobe for the determination of dorsoventral polarity in Dentalium vulgare (da Costa). Dev. Biol. 63: 233-242.

Gustafson, T. and L.Wolpert. 1967. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev. 42: 442-498.

Hall, H. G. and V. D. Vacquier. 1982. The apical lamina of the sea urchin embryo: Major glycoprotein associated with the hyaline layer. Dev. Biol. 89: 168-178.

Han, M. 1998. Gut reaction to Wnt signaling in worms. Cell 90: 581-584.

Hardin, J. D. 1988. The role of secondary mesenchyme cells during sea urchin gastrulation studied by laser ablation. Development 103: 317-324.

Hardin, J. D. 1990. Context-dependent cell behaviors during gastrulation. Semin. Dev. Biol. 1: 335-345.

Hardin, J. D. and L. Y. Cheng. 1986. The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. Dev. Biol. 115: 490-501.

Hardin, J. D. and D. R. McClay. 1990. Target recognition by the archenteron during sea urchin gastrulation. Dev. Biol. 142: 87-105.

Harkey, M. A. and A. M. Whiteley. 1980. Isolation, culture and differentiation of echinoid primary mesenchyme cells. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 189: 111-122.

Henry, J. J. and M. Q. Martindale. 1987. The organizing role of the D quadrant as revealed through the phenomenon of twinning in the polychaete Chaetopterus variopedatus. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 196: 449-510.

Henry, J. J. and R. A. Raff. 1990. Evolutionary change in the process of dorsoventral axis determination in the direct developing sea urchin, Heliocidaris erythrogramma. Dev. Biol. 141: 55-69.

Hodor, P. G. and C. A. Ettensohn. 1998. The dynamics and regulation of mesenchymal cell fusion in the sea urchin. Dev. Biol. 199: 111-124.

Horstadius, S. 1939. The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. Biol. Rev. 14: 132-179.

Horstadius, S.1973. Experimental Embryology of Echinoderms. Clarendon Press, Oxford.

Hotta, K., H. Takahashi, A. Erives, M. Levine and N. Satoh. 1999. Temporal expression patterns of 39 Brachyury-downstream genes associated with notochord formation in the ciona intestinalis embryo. Dev. Growth Diff: 41: 657-664.

Howard, E. W., L. A. Newman, D. W. Oleksyn, R. C. Angerer and L. M. Angerer. 2001. SpKrl: A direct target of β-catenin regulation required for endoderm differentiation in sea urchin embryos. Development 128:365-375.

Hunter, C. P. and C. Kenyon. 1996. Spatial and temporal controls target pal-l blastomere-specification activity to a single blastomere in C elegans embryos. Cell 87: 217-226.

Hutter, H. and R. Schnabel. 1994. glp-1 and inductions establishing embryonic axes in C. elegans. Development 120: 2051-2064.

Imai, K. S., N. Takada, N. Satoh and Y. Satou. 2000. β-Catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos. Development 127: 3009-3020.

Imai, K. S., N. Satoh and Y. Satou. 2002. Early embryonic expression of FCF4/6/9 gene and its role in the induction of mesenchyme and notochord in Ciona savignyi embryos. Development 129: 1729-1738.

Jeffery, W. R. and B. J. Swalla.1997. Tunicates. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 331-364.

Jeffery, W. R., N. Ewing, J. Machula, C. L. Olsen and B. J. Swalla. 1998. Cytoskeletal actin genes function downstream of HNF-3 in ascidian notochord development. Int. J. Dev. Biol. 42:1085-1092.

Karp, G. C. and M. Solursh. 1985. Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme in vitro. Dev. Biol. 112: 276-283.

Kemphues, K. J., J. R. Priess, D. G. Morton and N. Cheng. 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C elegans embryos. Cell 52: 311-320.

Kenny, A. P., D. Kozlowski, D. W. Oleksyn, L. M. Angerer and R. C. Angerer. 1999. SpSoxB1, a maternally encoded transcription factor asymmetrically distributed among early sea urchin blastomeres. Development 126: 5473-5483.

Kim, G. J., A. Yamada and H. Nishida. 2000. An FGF signal from endoderm and localized factors in the posterior-vegetal egg cytoplasm pattern the mesodermal tissues in the ascidian embryo. Development 127: 2853-2862.

Kimberly, E. L. and J. Hardin.1998. Bottle cells are required for the initiation of primary invagination in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 204: 235-250.

Kimble, J. and D. Hirsh. 1979. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans. Dev. Biol. 70: 396-418.

Kirby, C. M., M. Kusch and K. Kemphues. 1990. Mutations in the par genes of Caenorhabditis elegans affect cytoplasmic reorganization during the first cell cycle. Dev. Biol. 142: 203-215.

Lambert, J. D. L. and L. M. Nagy. 2001. MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusk Ilyanassa obsoleta. Development 128: 45-56.

Lambert, J. D. and L. M. Nagy. 2002. Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavage. Nature 420: 682-686.

Lane, M. C. and M. Solursh.1991. Primary nesenchyme cell migration requires a chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan. Dev. Biol. 143: 389-398.

Lane, M. C., M. A. R. Koehl, F. Wilt and R. Keller, 1993. A role for regulated secretion of apical matrix during epithelial invagination in the sea urchin. Development 117: 1049-1060.

Lepage, T., C. Sardet and C. Gache. 1992. Spatial expression of the hatching enzyrne gene in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 150: 23-32.

Lillie, F. R. 1898. Adaptation in cleavage. In Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole. Ginn, Boston, pp. 43-68.

Lillie, F. R. 1902. Differentiation without cleavage in the egg of the annelid Chaetopterus pergamentaceous. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungs-mech. Org. 14: 477-499.

Lin, R., S. Thompson and J. R. Priess. 1995.pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early C. elegans embryos. Cell 83: 599-609.

Logan, C. Y. and D. R. McClay. 1997. The allocation of early blastomeres to the ectoderm and endoderm is variable in the sea urchin embryo. Development 124: 2213-2223.

Logan, C. Y. and D. R. McClay. 1999. Lineages that give rise to endoderm and mesoderm in the sea urchin embryo. In S. A. Moody (ed.), Cell Lineage and Determination. Academic Press, New York, pp. 41-58.

Logan, C. Y., J. R. Miller, M. J. Ferkowicz and D. R. McClay. 1998. Nukar β-catenin is required to specify vegetal ceD fates in the sea urchin embryo. Development 126: 345-358.

Maduro, M. F., M. D. Meneghini, B. Bowerman, G. Broitman-Maduro and J. H. Rothman. 2001. Restriction of mesendoderm to a single blastomere by the combined action of SKN-I and a GSK-3β homolog is mediated by MED- 1 and –2 in C. elegans. Mol. Cell 7: 475-485.

Malinda, K. M. and C. A. Ettensohn. 1994. Primary mesenchyme cell migration in the sea urchin embryo: Distribution of directional cues. Dev. Biol. 164: 562-578.

Malinda, K. M., G. W. Fisher and C. A. Ettensohn. 1995. Four-dimensional microscopic analysis of the filopodial behavior of primary mesenchyme cells during gastrulation in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 172: 552-566.

Mango, S. E., C. J. Thorpe, P. R. Martin, S. H. Chamberlain and B. Bowerman. 1994a. Two maternal genes, apx-1 and pie-1, are required to distinguish the fates of equivalent blastomeres in early C. elegans embryos. Development 120: 2305-2315.

Mango, S. E., E. J. Lambie and J. Kimble. 1994b. The pha-4 gene is required to generate the pharyngeal primordium of Caenorhabditis elegans. Development 120: 3019-3031.

Martins, G. G., R. G. Summers and J. B. Morrill. 1998. Cells are added to the archenteron during and following secondary invagination in the sea urchin Lytechinus variegatus. Dev. Biol. 198: 330-342.

Maruyama, Y. K., Y. Nakeseko and S. Yagi. 1985. Localization of cytoplasmic determinants responsible for primary mesenchyme formation and gastrulation in the unfertilized eggs of the sea urchin Hemicentrotus pulcherrimus. J. Exp. Zool. 236: 155-163.

Mello, C. C., B. W. Draper and J. R. Priess. 1994. The maternal genes apx-1 and glp-1 and establishment of dorsal-ventral polarity in the early C elegans embryo. Cell 77: 95-106.

Mello, C. C., C. Schubert, B. Draper, W. Zhang, R. Lobel and J. R. Priess. 1996. The PIE-I protein and germline specification in C elegans embryos. Nature 382: 710-712.

Miller, J. R., S. E. Fraser and D. R. McClay. 1995. Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. Development 121: 2505-2511.

Minshull, J., J. J. Blow and T. Hunt. 1989. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated Xenopus eggs to enter mitosis. Cell 56:497-956.

Morgan, T. H. 1927. Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.

Morrill, J. B. and L. L. Santos. 1985. A scanning electron micrographical overview of cellular and extracellular patterns during blastulation and gastrulation in the sea urchin, Lytechinus variegatus. In R. H. Sawyer and R. M. Showman (eds.), The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development. University of South Carolina Press, Columbia, pp. 3-33.

Nakatani, Y., H. Yasuo, N. Satoh and H. Nishida. 1996. Basic fibroblast growth factor induces notochord formation and the expression of As-T, a Brachyury homolog, during ascidian embryogenesis. Development 122: 2023-2031.

Newport, J. W. and M. W. Kirschner. 1982a. A major developmental transition in early Xenopus embryos: 1. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell 30: 675-686.

Newport, J. W. and M. W. Kirschner. 1984. Regulation of the cell cycle during Xenopus laevis development. Cell 37: 731 -742.

Newrock, K. M. and R. A. Raff 1975. Polar lobe specific regulation of translation in embryos of Ilyanassa obsoleta. Dev. Biol. 42: 242-261.

Nigg, E. A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. BioEssays 17: 471 -480.

Nishida, H. 1987. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. Dev. Biol. 121: 526-541.

Nishida, H. 1992a. Determination of developmental fates of blastomeres in ascidian embryos. Dev. Growth Diff: 34: 253-262.

Nishida, H. 1992b. Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian Halocynthia roretzi. Development 116: 521-529.

Nishida, H. 1994. Localization of determinants for formation of the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian Halocynthia roretzi. Development 120: 3093-3104.

Nishida, H. and K. Sawada. 2001. macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. Nature 409: 724-729.

Oliveri, P., D. M. Carrick and E. H. Davidson. 2002. A regulatory gene network that directs micromere specification in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 246: 209-228.

Pines, M. (ed.). 1992 From Egg to Adult. Howard Hughes Medical Institute, MD, pp. 30-38.

Priess, R. A. and D. I. Hirsh. 1986. Caenorhabditis elegans morphogenesis: The role of the cytoskeleton in elongating the embryo. Dev. Biol. 117: 156-173.

Priess, R. A. and J. N.Thomson. 1987. Cellular interactions in early C elegans embryos. Cell 48: 241-250.

Raff, R. A. and T. C. Kaumman. 1983. Embryos, Genes, and Evolution: The Developmental-Genetic Basis of Evolutionary Change. Macmillan, New York.

Raich, W. B., C. Agbunag and J. Hardin 1999. Rapid epithelial-sheet sealing in the Caenorhabditis elegans embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. Curr. Biol. 9: 1139-1146.

Ransick, A. and E. H. Davidson.1993. A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo. Science 259: 1134-1138.

Ransick, A. and E. H. Davidson. 1995. Micromeres are required for normal vegetal plate specification in sea urchin embryos. Development 121: 3215-3222.

Render, J. 1991. Fate maps of the first quartet micromeres in the gastropod Ilyanassa obsolete. Development 113: 495-501.

Render, J. 1997. Cell fate maps in the Ilyanassa obsoleta embryo beyond the third division. Dev. Biol. 189: 301 -310.

Reverberi, G. and A. Minganti. 1946. Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine spermentale sull'ouvo di Ascidiella aspersa e di Ascidia malaca allo stadio di 8 blastomeri. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 20: 199-252.

Rocheleau, C. E. and 8 others. 1997. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early C. elegans embryos. Cea 90: 707-716.

Roegiers, F., A. McDougall and C. Sardet. 1995. The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wave that directs the first phase of c,vtoplasmic reorganization in the ascidian egg. Development 121: 3457-3466.

Ruffins, S. W. and C. A. Ettensohn. 1996. A fate map of the vegetal plate of the sea urchin (Lytechinus variegatus) mesenchyme blastula. Development 122: 253-263.

Satoh, N. 1978. Cellular morphology and architecture during early morphogenesis of the ascidian egg: An SEM study. Biol. Bull. 155: 608-614.

Satou, Y., K. S. Imai and N. Satoh. 2001. Early embryonic expression of a LIM-homeobox gene Cs-lhx3 is downstream of β-catenin and responsible for the endoderm differentiation in Ciona savignyi embryos. Development 128: 3559-3570.

Sawada, T. and G. Schatten. 1989. Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilizato Adult. tion and early development in the asc dian Bethesda Molgula occidentalis. Dev. Biol. 132: 331-342.

Schierenberg, E. 1997. Nematodes, the round-worms. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 131-148.

Schroeder, T. E. 1972. The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in deaving Arbacia eggs. J. Cell Biol. 53: 419-434.

Schroeder, T. E. 1973. Cell constriction: Contractile role of microfilaments in division and development. Am. Zool. 13: 687-696.

Schroeder, T. 1981. Development of a "primitive" sea urchin (Eucidaris tribuloides): Irregularities in the hyaline layer, micromeres, and primary mesenchyme. Biol. Bull. 161: 141-151.

Seydoux, G., C. C. Mello, J. Pettitt, W. B. Wood, J. R. Priess and A. Fire. 1996. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of C elegans. Nature 382: 713-716.

Sherwood, D. R. and D. R. McClay 1999. LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo. Development 126:1703-1713.

Skiba, F. and E. Schierenberg. 1992. Cell lineage, debelopmental timing, and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. Dev. Biol. 151: 597-610.

Smith, P., W. M. Leung-Chiu, R. Montgomery, A. Orsborn, K. Kuznicki, E. Gressman-Coberly, L. Mutapcic and K. Bennet. 2002. The GLH proteins, C. elegans P-granule components, associate with CSN-5 and KGB-I, proteins necessary for fertility, and with ZYX-I, a predicted cytoskeletal protein. Dev. Biol. 251: 333-347.

Speksnijder, J. E., C. Sardet and L. F. Jaffe. 1990. The activation wave of calcium in the ascidian egg and its role in ooplasmic segregation. J. Cell Biol. 110: 1589-1598.

Strome, S. and W. B. Wood. 1983. Generation of asymmetry and segregation of germ-like granules in early Caenorhabditis elegans embryos. Cell 35: 15-25.

Sturtevant, M. H. 1923. Inheritance of direction of coiling in Limnaea. Science 58: 269-270.

Sugiyama, K. 1972. Occurrence of mucopolysaccharides in the early development of the sea urchin embryo and its role in gastrulation. Dev. Growthy Diff. 14: 62-73.

Sulston, J. E. and H. R. Horvitz. 1977. Postembryonic cell lineages of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev. Biol. 56: 110-156.

Sulston, J. E., J. Schierenberg, J. White and N. Thomson. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev. Biol. 100 64-119.

Summers, R. G., 1. B. Morrill, A. Leith, M. Marko, D. W. Piston and A. T. Stonebraker. 1993. A stereometric analysis of karyogenesis, cytokinesis, and cell arrangements during and following fourth cleavage period in the sea urchin, Lytechinus variegatus. Dev. Growth Diff 35: 41-58.

Sweet, H. C. 1998. Specification of first quartet micromeres in Ilyanassa involves inherited factors and position with respect to the inducing D macromere. Development 125: 4033-4044.

Sweet, H. C., P. G. Hodor and C. A. Ettensohn. 1999. The role of micromere signaling in Notch activation and mesoderm specification during sea urchin embryogenesis. Development 126: 5255-5265.

Swenson, K. L., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in Xenopus oocytes. Cell 47: 861-870.

Sze, L. C. 1953. Changes in the amount of deoxyribonucleic acid in the development of Rana pipiens. J. Exp. Zool. 122: 577-601.

Thorpe, C. J., A. Schlesinger, J. C. Carter and B. Bowerman. 1997. Wnt signaling polarizes an early C. elegans blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. Cell 90: 695-705.

Trinkaus, J. P.1984. Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo, 2nd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Tung,T.C., S.C.Wu, Y.F.Yel, K.S.Liand M.C. Hsu. 1977. Cell differentiation in ascidians studied by nuclear transplantation. Scientia Sinica 20: 222-233.

van den Biggelaar, J. A. M. 1977. Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in Patella vulgata. J. Morphol. 154: 157-186.

Verdonk, N. H. and I. N. Cather. 1983. Morphogenetic determination and differentiation. In N. H. Verdonk, J. A. M. van den Biggelaar and A. S. Tompa (eds.), The Mollusca. Academic Press, New York, pp. 215-252.

Vonica, A., W. Weng, B. M. Gumbiner and J. M. Venuti. 2000. TCF is the nuclear effector of the β-catenin signal that patterns the sea urchin animal-vegetal axis. Deu BioL 217: 230-243.

Wallenfang, M. R. and G. Seydoux. 2000. Polarization of the anterior-posterior axis of C elegans is a microtubule-directed process. Nature 408: 89-92.

Wang, L., C. R. Eckmann, L. C. Kadyk, M. Wickens and J. Kimble. 2002. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in Caenorhabditts elegans. Nature 419: 312-316.

Welsh, J. H. 1969. Mussels on the move. Nat. Hist. 78: 56-59.

Wessel, G. M. and D. R. McClay.1985. Sequential expression of germ layer specific molecules in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 111: 451-463.

Wessel, G. M., R. B. Marchase and D. R. McClay, 1984. Ontogeny of the basal lamina in the sea urchin embryo. Dev. Biol. 103: 235-245.

White, J. C., W. B. Amos and M. Fordham. 1988. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. 105: 418.

Whittaker, J. R. 1982. Muscle cell lineage can change the developmental expression in epidermal lineage cells of ascidian embryos. Dev. Biol. 93: 463-470.

Wikramanayake, A. H., L. Huang and W. H. Klein. 1998. -catenin is essential for patterning the maternally specified animal-vegetal axis in the sea urchin embryo. Proc. Nat. Acad Sci USA 95: 9343-9348.

Wilson, E. B. 1898. Cell lineage and ancestral reminiscences. In Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole. Ginn, Boston, pp. 212.

Wilson, E. B. 1904. Experimental studies on germinal localization. I. The germ regions of the egg of Dentalium. II. Experiments on the cleavage-mosaic in Patella and Dentalium. J. Exp. Zool. 1: 1-72.

Wilson, E. B. 1923. The Physical Basis of Life. Yale University Press, New Haven. p. 10.

Wolpert, L. and T. Gustafson. 1961. Studies in the cellular basis of morphogenesis of the sea urchin embryo: The formation of the blastula. Exp. Cell Res. 25: 374-382.

Wray, G. A. 1999. Introduction to sea urchins. In S. A. Moody (ed.), Cell Lineage and Detetmination. Academic Press, New York, pp. 3-9.

Yuh, C.-H, H. Bolouri and E. H. Davidson. 2001. Cis-regulatory logic in the endo16 gene: Switching from a specification to a differentiation mode of control. Development 128: 617-629.

Capítulo 9 La genética de especificación del eje en Drosophila

Aquellos de nosotros que estamos trabajado en Drosophila *encontramos un punto particular a la pregunta. Para el material genético disponible es todo lo que podría ser deseado, y hasta experimentos embriológicos pueden ser hechos. ...Esto es para nosotros hacer uso de estas oportunidades. Tenemos una historia completa para desenredar, debido a que podemos trabajar cosas desde ambos extremos inmediatamente.*

JACK SCHULTZ (1935)

La ventaja principal de Drosophila *al principio fue que los historiadores la han pasado por alto: éste era un organismo excelente para proyectos de estudiantes.*

ROBERT E. KOHLER (1994)

GRACIAS EN GRAN PARTE A LOS ESTUDIOS del laboratorio de Thomas Hunt Morgan durante la primera década del siglo XX, se conoce más acerca de la genética de *Drosophila* que sobre cualquier otro organismo multicelular. Las razones tienen que ver con las moscas y la gente que primero las estudió. *Drosophila* es fácil de criar, resistente, prolífica, tolerante a diversas condiciones y los cromosomas politénicos de sus larvas son fáciles de identificar (véase cap. 4). Las técnicas para cría e identificación de mutantes son fáciles de aprender. Además, el progreso de la genética de *Drosophila* fue ayudado por el acceso relativamente libre de cada científico a los mutantes y a las técnicas de cada uno de los otros investigadores. Los mutantes fueron considerados propiedad de la comunidad científica en su totalidad, y el laboratorio de Morgan estableció la base de datos y la red de intercambio por medio de la cual cualquiera podría obtenerlos.

Los estudiantes universitarios (comenzando con Calvin Bridges y Alfred Sturtevant) tuvieron una función importante en la investigación de *Drosophila*, lo que le dio su original popularidad como una fuente para proyectos de investigación de estudiantes. Como el historiador Robert Kohler observó (1994): "Los departamentos de biología estaban pobres de dinero pero ricos en un recurso: mano de obra de estudiantes económica, entusiasta y renovable." El programa de genética de *Drosophila* fue "diseñado por personas jóvenes para ser el juego de personas jóvenes," y los estudiantes establecieron las reglas para la investigación en *Drosophila*: "Ningún secreto de fabricación, ningún monopolio, ninguna usurpación de ideas, ninguna emboscada."

Pero *Drosophila* era un organismo dificultoso sobre el cual estudiar la embriología. Aunque Jack Schultz y otros intentaron relacionar la genética de *Drosophila* a su desarrollo, los embriones de mosca demostraron ser demasiado complejos e insuperables para estudiar, ya que no eran lo suficientemente grandes para manipular experimentalmente ni lo suficientemente transparentes para observar. No fue sino hasta las técnicas de biología molecular que les permitió a los investigadores identificar y manipular los genes y RNA de insectos que su genética pudo ser relacionada con su desarrollo. Y cuando esto sucedió, se produjo una revolución en el campo de la biología. La fusión de nuestro conocimiento sobre los aspectos moleculares de la genética de *Drosophila* con nuestro conocimiento del desarrollo de la mosca construyó los fundamentos sobre los cuales están basadas las ciencias actuales de la genética del desarrollo y la biología del desarrollo evolutiva.

DESARROLLO TEMPRANO DE DROSOPHILA

En el último capítulo, se discutió la especificación de las células embrionarias tempranas por determinantes citoplasmáticos almacenados en el ovocito. Las membranas celulares que se forman durante la segmentación establecen la región de citoplasma incorporada en cada nueva blastómera y los determinantes

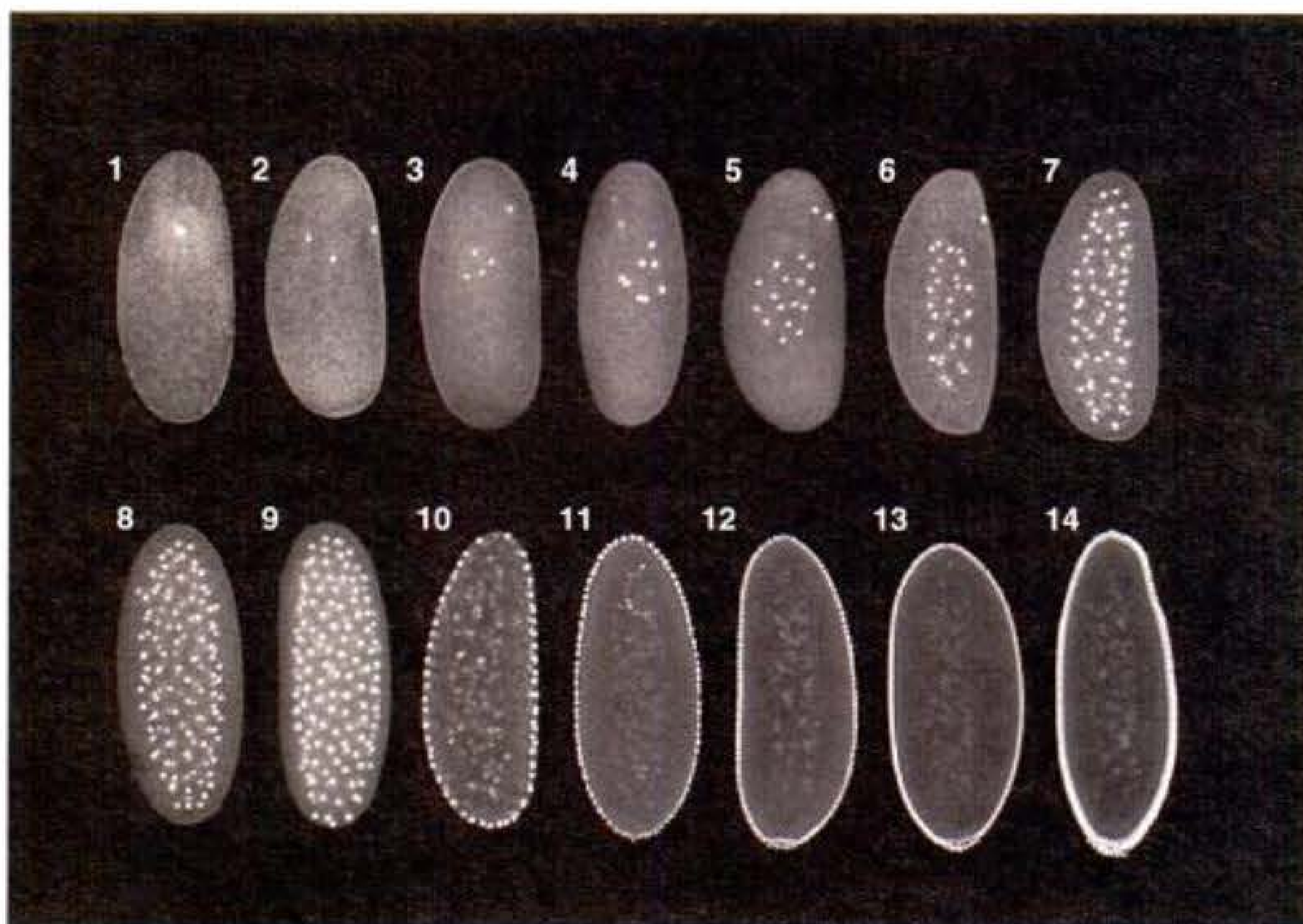


Fig. 9-1. Microfotografías confocales de láser de cromatina teñida que muestra la segmentación superficial en el embrión de *Drosophila*. Las divisiones nucleares tempranas se producen centralmente. Los números se refieren al ciclo de división celular. En el décimo ciclo de división celular (estadio de 512 núcleos, dos horas después de la fecundación), se forman las células polares en la región posterior, y los núcleos y sus islas de citoplasma (*enérgidas*) migran hacia la periferia de la célula. Esto genera el blastodermo sincitial. Después del decimotercer ciclo, las membranas del ovocito ingresan entre los núcleos para formar el blastodermo celular. (Fotografías cortesía de W. Baker y G. Schubiger.)

morfogenéticos incorporados a continuación dirigen la expresión diferencial del gen en cada blastómera. Sin embargo, durante el desarrollo de *Drosophila* las membranas celulares no se forman hasta después de trece divisiones nucleares. Previo a este momento, todos los núcleos comparten un citoplasma común y el material puede difundirse a través del embrión. En estos embriones, la especificación de los tipos celulares a lo largo de los ejes anteroposterior y dorsoventral es llevada a cabo por las interacciones de materiales citoplasmáticos *dentro* de la única célula multinucleada. Además, el comienzo de las diferencias anteroposterior y dorsoventral son controladas por la posición del huevo (gameto femenino)* dentro del ovario de la madre. Mientras que el sitio de ingreso del espermatozoide puede fijar los ejes en ascidias y nematodos, los ejes anteroposterior y dorsoventral de la mosca son especificados mediante interacciones entre el huevo (gameto femenino) y las células foliculares que lo rodean.

SITIO WEB 9.1 **Fecundación de *Drosophila* (*Drosophila* fertilization).** La fecundación de *Drosophila* se puede producir solamente en la región del ovocito que llegará a ser la parte anterior del embrión. Además, la cola del espermatozoide parece permanecer en esta región.

Segmentación

La mayoría de los huevos (cigotos) de insectos experimentan **segmentación superficial**, por medio de la cual una gran masa de vitelo localizada centralmente restringe la segmentación al borde o aro citoplasmático del cigoto. Una de las características fascinantes de este patrón de segmentación es que las células no se forman hasta después que los núcleos se han dividido. La segmentación en el huevo (cigoto) de *Drosophila* se muestra en la figura 9-1. El núcleo del cigoto experimenta varias divisiones mitóticas dentro de la porción central del cigoto. En *Drosophila*, se producen 256 núcleos mediante una serie de ocho divisiones nucleares que promedian 8 minutos cada una. A continuación los núcleos migran a la periferia del huevo, donde continúa la mitosis, aunque es cierto que a un ritmo progresivamente más lento. Durante el noveno ciclo de división, cerca de cinco núcleos alcanzan la superficie del polo posterior del embrión. Estos núcleos llegan a ser incluidos por las membranas celulares y generan las **células polares** que dan origen a los gametos del adulto. La mayoría de los otros núcleos alcanzan la periferia del embrión en el décimo ciclo y luego experimentan cuatro divisiones más a un ritmo progresivamente más lento. Durante estos estadios de división nuclear, el embrión es denominado **blastodermo sincitial**, en el sentido de que todos los núcleos segmentados están contenidos dentro de un citoplasma común. No existen otras membranas celulares que las del huevo mismo (las del cigoto original).

Aunque los núcleos se dividen dentro de un citoplasma común, esto no significa que el citoplasma es uniforme. Karr y Alberts (1986) han demostrado que cada núcleo dentro del blastodermo sincitial está contenido dentro de su propio territorio pequeño de proteínas del citoesqueleto. Cuando los núcleos alcanzan la periferia del huevo (estadio de blastodermo sincitial) durante el décimo ciclo de segmentación, cada núcleo llega a rodearse de microtúbulos y microfilamentos. Los núcleos y sus islas asociadas de citoplasma son denominados **energidas**. La figura 9-2 muestra los núcleos y sus microfilamentos esenciales y los dominios de microtúbulos en la profase de la duodécima división mitótica.

Siguiendo el decimotercer ciclo de división, la membrana plasmática del huevo (estadio de blastodermo sin-

* *Nota del traductor:* en la mosca, como en otros organismos, con frecuencia se utiliza la denominación de huevo para el gameto femenino y los estados posteriores a la fecundación, pero es conveniente recordar que aun cuando se hable de huevo podemos estar en distintas etapas del desarrollo. Para facilitar su comprensión será aclarado el estadio de desarrollo en el que se encuentra el huevo de la mosca.

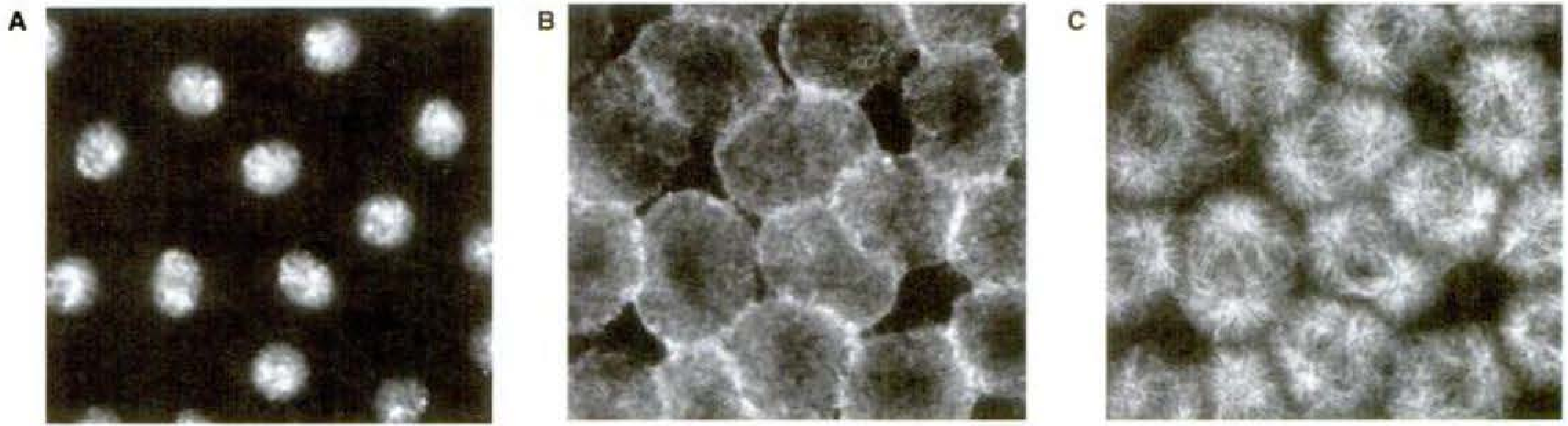
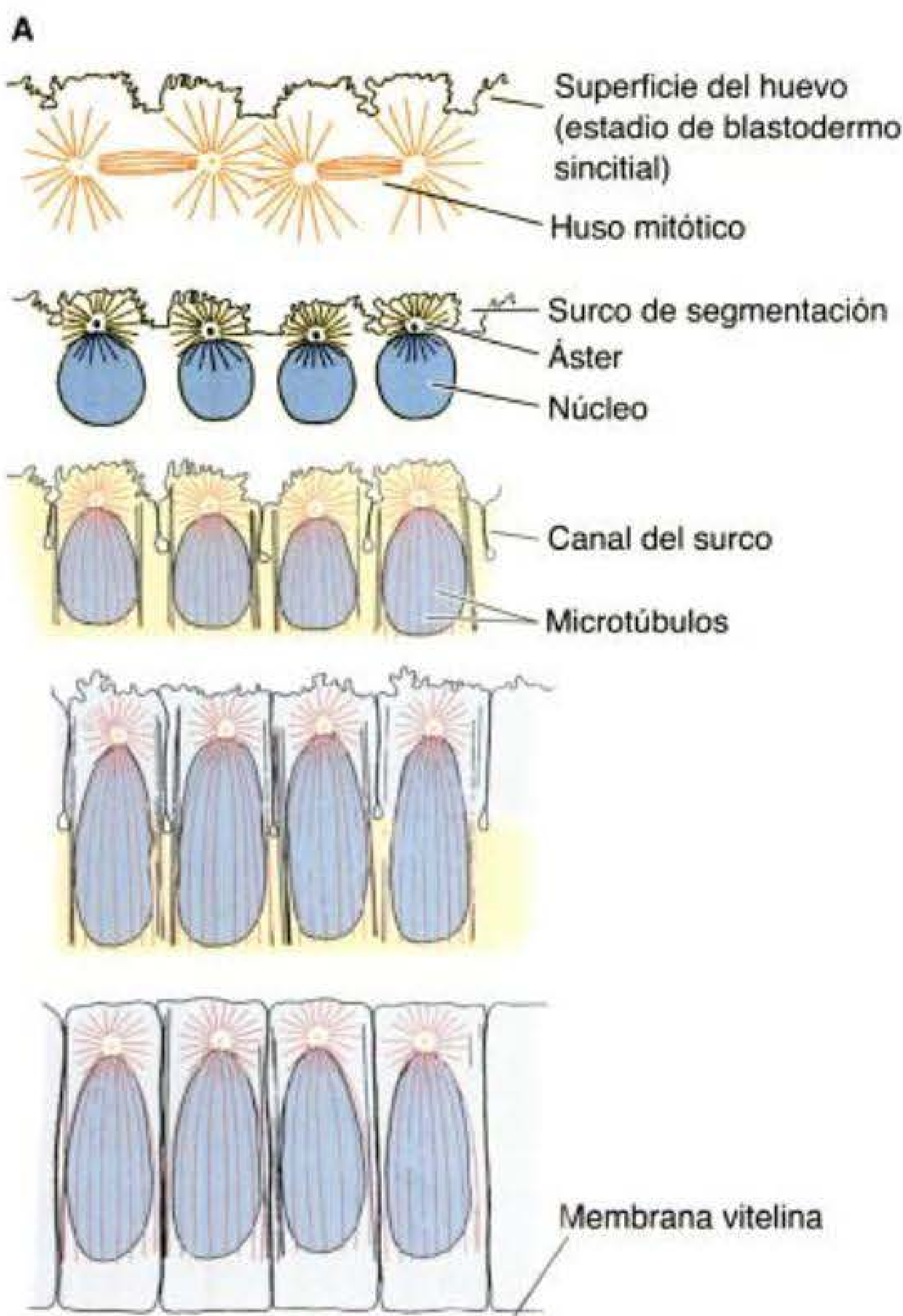


Fig. 9-2. Localización del citoesqueleto alrededor de los núcleos en el blastodermo sincitial de *Drosophila*. Un embrión de *Drosophila* ingresando a la profase mitótica de su duodécima división fue seccionado y se le hizo una triple tinción. **A.** Los núcleos fueron localizados mediante un colorante que se une al DNA. **B.** Los microfilamentos fueron identificados con el uso de un anticuerpo fluorescente para actina. **C.** Los microtúbulos fueron reconocidos mediante un anticuerpo fluorescente para tubulina. Se pueden ver los dominios del citoesqueleto que rodean a cada núcleo. (De Karr y Alberts 1986; fotografías cortesía de T. L. Karr.)

citial) se pliega hacia adentro entre los núcleos, separando finalmente a cada núcleo somático en una célula individual (fig. 9-3). Este proceso crea el **blastodermo celular**, en el que todas las células están organizadas en una capa única rodeando al centro de vitelo del huevo (ahora en estadio de blastodermo celular) (Turner y Mahowald 1977; Foe y Alberts 1983). Como en cualquier otra formación celular, la formación del blastodermo celular involucra una delicada interacción entre los microtúbulos y los microfilamentos. La primera fase de celularización del blastodermo está caracterizada por la invaginación de membranas celulares y de su red de microfilamentos de actina subyacente en las regiones entre los núcleos para formar los canales del surco. Este proceso puede inhibirse mediante drogas que bloquean a los microtúbulos. Después de que los canales del surco han pasado el nivel de los núcleos, se produce la segunda fase de celularización. Aquí, se incrementa el ritmo de invaginación y los complejos actina-membrana comienzan a contraer a lo que será el extremo basal de la célula (Schejter y Wieschaus 1993; Foe y col. 1993; Mazumdar y Mazumdar 2002). En *Drosophila*, el blastodermo celular consiste en aproximadamente 6000 células y se forma dentro de las 4 horas de la fecundación.



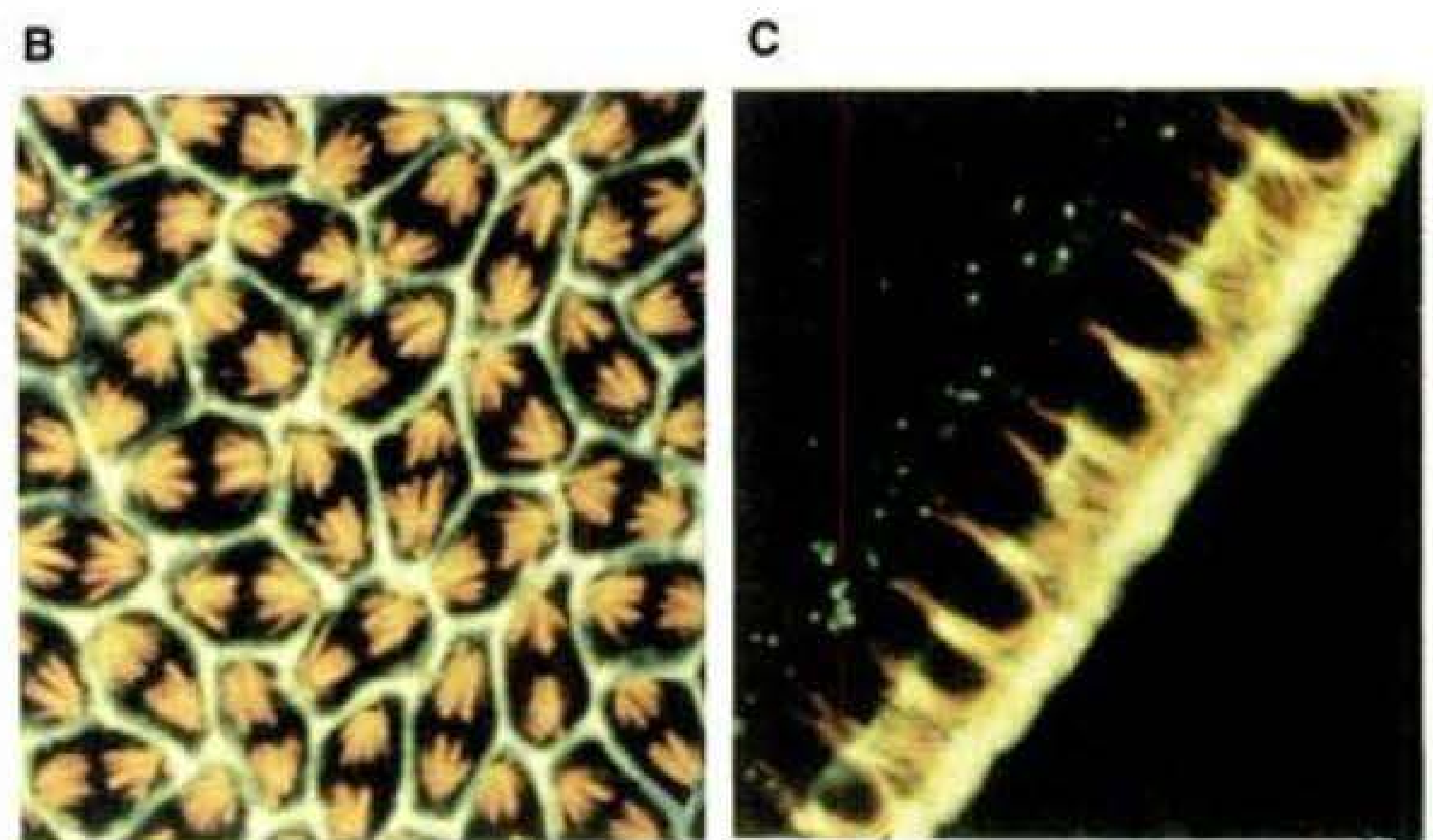


Fig. 9-3. Formación del blastodermo celular en *Drosophila*. **A.** Series de desarrollo que muestran una celularización progresiva. **B.** Microfotografías de fluorescencia confocal de núcleos dividiéndose durante la celularización del blastodermo. Mientras que no hay límites celulares, la actina (verde) puede verse formando regiones dentro de cada núcleo en división. Los microtúbulos del aparato mitótico son teñidos de rojo con anticuerpos para tubulina. **C.** Sección transversal durante la celularización. A medida que se forma la célula, los dominios de actina se extienden dentro del huevo. (A, según Fullilove y Jacobson 1971; B y C, de Sullivan y col. 1993; fotografías cortesía de E. Theurkauf y W. Sullivan.)

La transición a blástula media

Después de que cada núcleo alcanza la periferia, el tiempo requerido para completar cada una de las siguientes cuatro divisiones llega a ser progresivamente más largo. Mientras que los ciclos 1 a 10 tienen cada uno una duración de 8 minutos, el ciclo 13, el último ciclo en el blastodermo sincitial, toma 25 minutos para completarse. El ciclo 14, en el que el embrión de *Drosophila* forma células (es decir, después de 13 divisiones), es asincrónico. Algunos grupos de células completan su ciclo en 75 minutos, mientras que otros grupos de células toman 175 minutos (fig. 9-4; Foe 1989). La transcripción desde los núcleos (que comienza alrededor del ciclo decimoprimero) está enormemente potenciada en esta etapa. Este enlentecimiento de la división nuclear y el concomitante incremento en la transcripción de RNA es referido frecuentemente como la transición a blástula media (véase cap. 8). Tal transición también se observa en los embriones de numerosos filos de vertebrados e invertebrados.

El control de este enlentecimiento mitótico (más obvio en embriones de *Xenopus* y de *Drosophila*) parece ser efectuado por la proporción de la cromatina en relación al citoplasma (Newport y Kirschner 1982; Edgar y col. 1986a). Edgar y sus colegas compararon el desarrollo temprano de los embriones de *Drosophila* tipo salvaje con los de un mutante haploide. Estos embriones de *Drosophila* haploides tenían la mitad de la cantidad de cromatina tipo salvaje en cada división celular. Por lo tanto un embrión haploide en el ciclo 8 de división celular tiene la misma cantidad de cromatina que la que tiene un embrión tipo salvaje en el ciclo 7. Los investigadores hallaron que mientras los embriones tipo salvaje formaban un blastodermo celular inmediatamente después de la decimotercera división, los embriones haploides experimentaban una división extra, decimocuarta, antes de la celularización. Además, la duración de los ciclos 11 a 14 en los embriones tipo salvaje se correspondía con la de los ciclos 12 a 15 de los embriones haploides. Por esta razón, los embriones haploides siguen un patrón similar al de los embriones tipo salvaje, solo retrasados por una división celular.

SITIO WEB 9.2 **La regulación de la segmentación en *Drosophila* (The regulation of *Drosophila* cleavage).** El control del ciclo celular en *Drosophila* es una historia de cómo el núcleo del cigoto toma gradualmente el control de los mRNA y proteínas almacenados en el citoplasma del ovocito.

SITIO WEB 9.3 **El desarrollo temprano de otros insectos (The early development of other insects).** *Drosophila* es una especie sumamente derivada. Hay otras especies de insectos que se desarrollan en direcciones muy diferentes de la mosca de la fruta "estándar".

Gastrulación

La gastrulación comienza en el momento de transición a gástrula media. Los primeros movimientos de la gastrulación de *Drosophila* segregan el mesodermo, el endodermo y el ectodermo presuntivos. El mesodermo prospectivo –cerca de 1000 células que constituyen la línea media ventral del embrión– se pliega hacia el interior para producir el **surco ventral** (fig. 9-5A). Este surco finalmente se separa de la superficie para convertirse en un tubo ventral dentro del embrión. Éste luego se aplana para formar una capa de tejido mesodérmico por debajo del ectodermo ventral (véase fig. 9-40). El endodermo prospectivo se invagina como dos bolsillos en los extremos anterior y posterior del surco ventral (fig. 9-5B, C). Las células polares se internalizan junto con el endodermo. En este momento, los embriones se incurvan para formar el **surco cefálico.**

Las células ectodérmicas sobre la superficie y el mesodermo experimentan convergencia y extensión, migrando hacia la línea media ventral para formar la **banda germinal**, un grupo de células a lo largo de la línea media ventral que incluye a todas las células que formarán el tronco del embrión. La banda germinal se extiende posteriormente y, quizás debido al estuche del huevo, se envuelve alrededor de la superficie superior (dorsal) del embrión (fig. 9-5D). Por lo tanto, al final de la formación de la banda germinal, las células destinadas a formar las es-

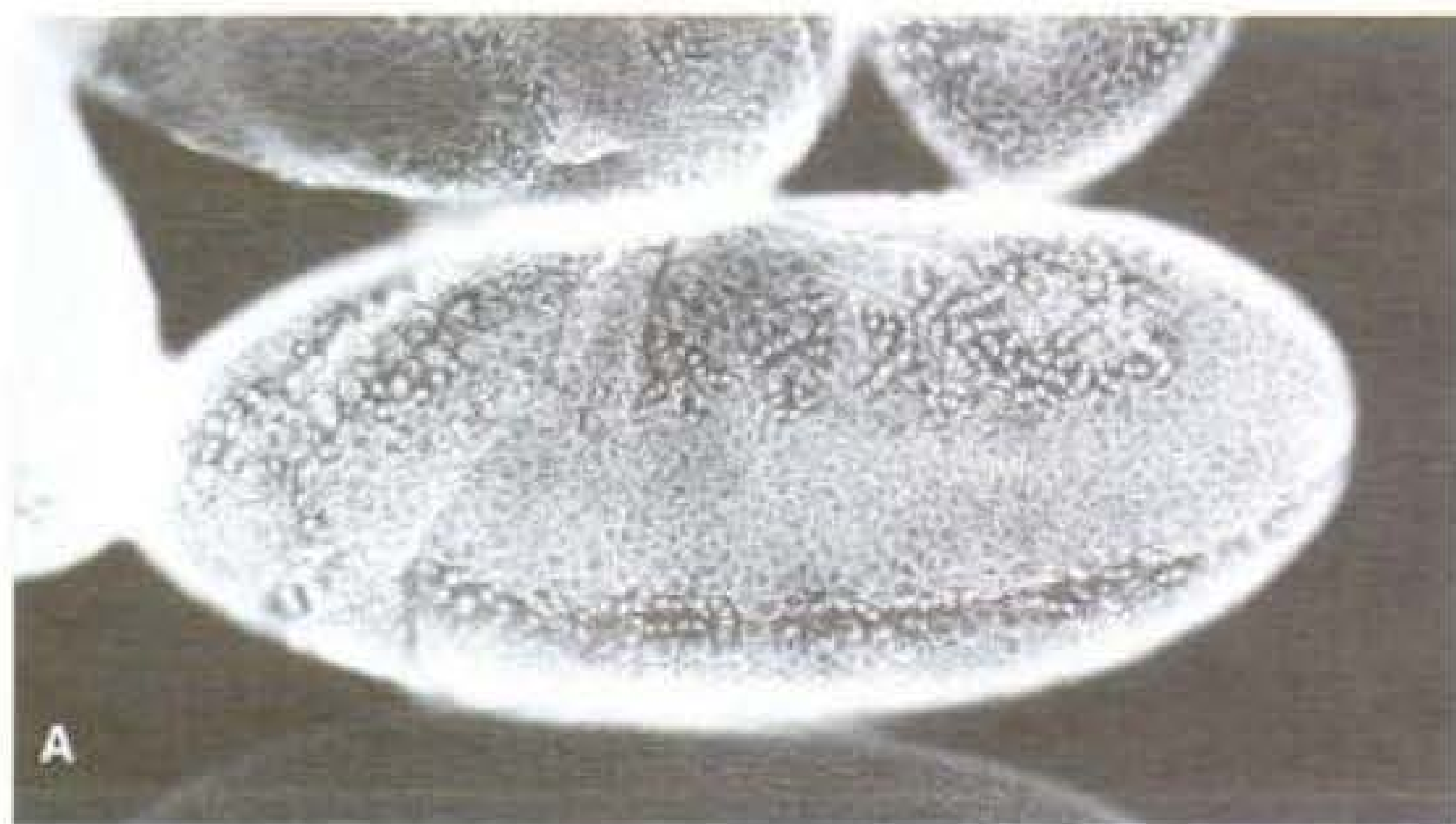




Fig. 9-4. Diferencias en los ritmos regionales de división celular en los embriones de *Drosophila*. **A.** El embrión de gástrula temprana está teñido con anticuerpos fluorescentes para tubulina para mostrar los microtúbulos de los husos mitóticos. **B.** Los anticuerpos para la proteína ciclina A muestran que ésta es degradada después de la mitosis y no es vista en las regiones que experimentan la división celular. (De Edgar y O'Farrell 1989; fotografías cortesía de B. A. Edgar.)

tructuras más posteriores de la larva están localizadas inmediatamente detrás de la futura región de la cabeza. En este momento, comienzan a aparecer los segmentos del cuerpo, que dividen el ectodermo y el mesodermo. Luego la banda germinal se repliega, colocando los segmentos posteriores presuntivos en la punta posterior del embrión (fig. 9-5E).

Mientras que la banda germinal está en su posición extendida, se producen varios procesos morfogenéticos clave: organogénesis, segmentación y segregación de los discos imaginales* (fig. 9-5E). Además el sistema nervioso se forma desde dos regiones del ectodermo ventral. Como se describió en el capítulo 6, los neuroblastos se diferencian a partir de su ectodermo neurogénico dentro de cada segmento (y también desde regiones no segmentadas del ectodermo de la cabeza). Por lo tanto, en insectos como *Drosophila*, el sistema nervioso está localizado ventralmente, en lugar de derivar desde un tubo neural dorsal como en vertebrados (fig. 9-6).

El plan corporal general de la *Drosophila* es el mismo en el embrión, en la larva y en el adulto, cada uno tiene un extremo de la cabeza bien diferenciado y una cola definida, entre los que hay unidades segmentarias repetidas (fig. 9-7). Tres de estos segmentos forman el tórax, mientras que otros ocho segmentos forman el abdomen. Cada segmento de la mosca del adulto tiene su propia identidad. El primer segmento torácico, por ejemplo, tiene solo patas; el segundo segmento torácico tiene patas y alas; y el tercer segmento torácico tiene patas y halterios (balanceadores). Los segmentos torácico y abdominal pueden además distinguirse entre sí por sus diferencias en la cutícula. ¿Cómo se origina este patrón? Durante la década de 1990, los enfoques combinados de la biología molecular, la genética y la embriología han llevado a un modelo detallado que describe cómo se genera un patrón segmentado a lo largo del eje anteroposterior y cómo cada segmento se diferencia de los otros.

Los ejes anteroposterior y dorsoventral de *Drosophila* se forman en ángulos rectos entre sí y son determinados por la posición del ovocito dentro de las células foliculares del ovario. El resto de este capítulo se divide en tres partes principales. La primera parte se ocupa de cómo se especifica el eje anteroposterior y de cómo éste determina la identidad de cada segmento. La segunda parte se ocupa de cómo se especifica el eje dorsoventral mediante interacciones entre el ovocito y sus células foliculares que lo rodean. La tercera parte se ocupa de cómo se especifican los tejidos embrionarios para llegar a convertirse en órganos particulares mediante su colocación a lo largo de estos dos ejes.

VADE MECUM[2] **Desarrollo de *Drosophila* (*Drosophila* development).** El CD-ROM contiene algunas secuencias destacables del desarrollo de *Drosophila*, que incluyen la segmentación y la gastrulación. Este segmento también proporciona acceso al ciclo vital de la mosca. El código de color superpuesto sobre las capas germinales permite un fácil entendimiento de los movimientos tisulares. **[Hacer clic sobre Fruit Fly]**

* Los discos imaginales son las células reservadas para producir las estructuras del adulto. Los detalles de la diferenciación del disco imaginal serán discutidos en el capítulo 18. Para más información sobre la anatomía del desarrollo de *Drosophila*, véase Bate y Martinez-Arias 1993; Tyler y Schetzer 1996; y Schwalm 1997).

ORÍGENES DE LA POLARIDAD ANTEROPOSTERIOR

La polaridad anteroposterior del embrión, de la larva y del adulto tiene su origen en la polaridad anteroposterior del gameto femenino (fig. 9-8). Los **genes efectores maternos** expresados en el ovario de la madre producen RNA mensajeros que son colocados en diferentes regiones del gameto femenino. Estos mensajeros codifican proteínas reguladoras de la transcripción y de la traducción que difunden a través del blastodermo sincitial y activan o reprimen la expresión de ciertos genes cigóticos. Dos de estas proteínas, **Bicoid** y **Hunchback** (jorobado), regulan la producción de estructuras anteriores, mientras que otro par de proteínas especificadas maternamente, **Nanos** y **Caudal**, regulan la formación de las partes posteriores del embrión. A continuación, los genes cigóticos regulados por estos efectores maternos son expresados en ciertos dominios extensos (cerca de tres segmentos) y parcialmente superpuestos. Estos genes son denominados **genes gap** (debido a que las mutaciones en éstos causan intervalos o huecos –del inglés, *gap*– en el patrón de segmentación), y están entre los primeros genes transcritos en el embrión. Diferentes concentraciones de las proteínas del gen gap causan la transcripción de los **genes pair-rule** (regla de los pares), que dividen al embrión en unidades periódicas. La transcripción de los diferentes genes pair-rule resulta en un patrón en franjas de siete bandas verticales perpendiculares al eje anteroposterior. Las proteínas del gen pair-rule activan la transcripción de los **genes de polaridad de segmento**, cuyos productos de mRNA y proteína dividen al embrión en 14 unidades segmentarias extensas, estableciendo la periodicidad del embrión. Al mismo tiempo, los productos proteicos de los genes gap, pair-rule y polaridad de segmento interactúan para regular otra clase de genes, los **genes selectores homeóticos**, cuya transcripción determina el destino de desarrollo de cada segmento.

Los genes efectores maternos

Evidencia embriológica de la regulación de la polaridad por el citoplasma del ovocito

Los experimentos de embriología clásica demostraron que hay al menos dos "centros organizadores" en el huevo del insecto, uno en el extremo anterior y otro en el extremo posterior del huevo. Por ejemplo, Klaus Sander (1975) halló que si ligaba al huevo* en el desarrollo temprano, separando la mitad anterior de la mitad posterior,

* *Nota del traductor:* el estadio de desarrollo del huevo referido en esta sección puede ser desde cigoto, blastodermo sincitial a blastodermo celular.

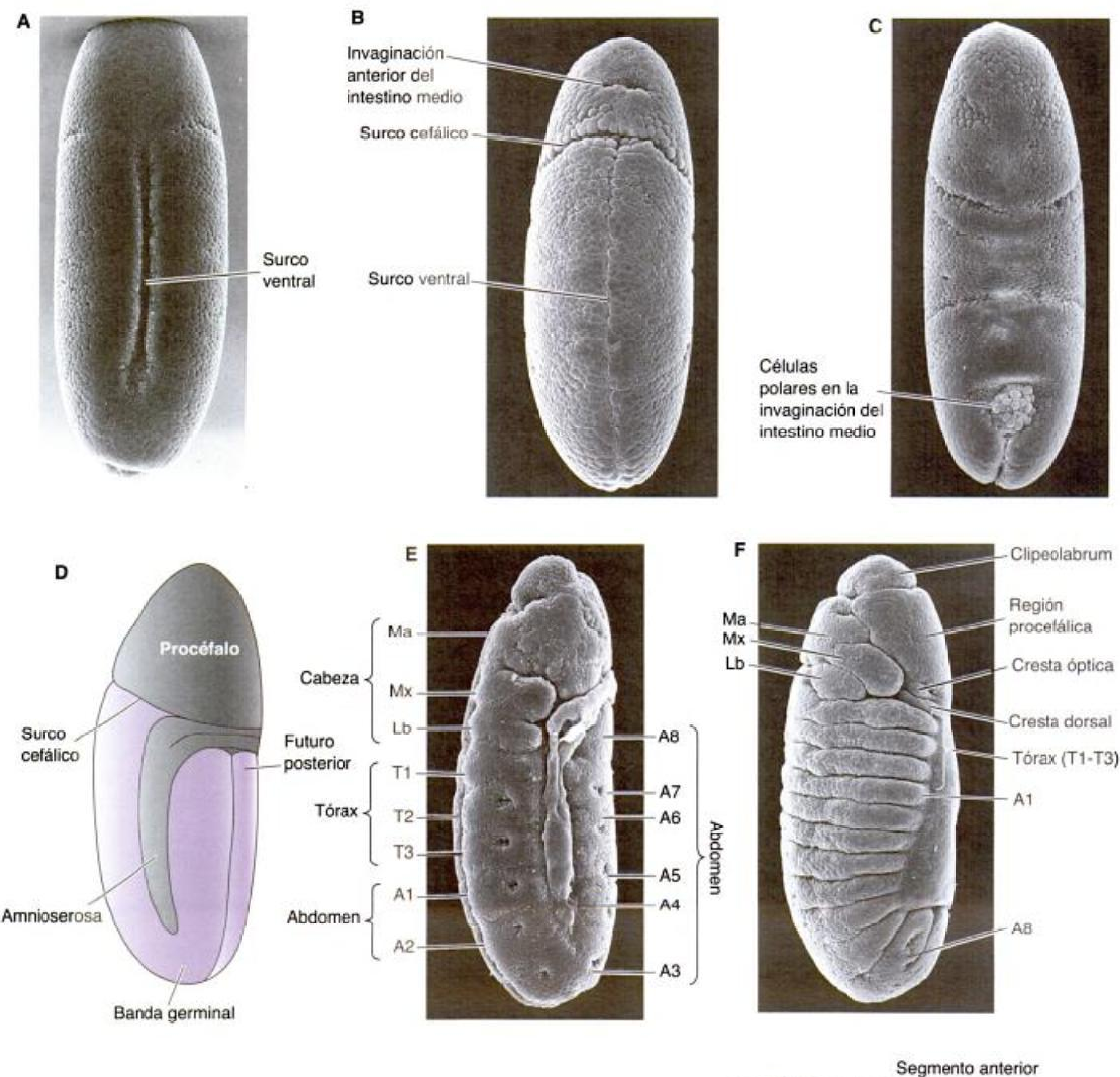


Fig. 9-5. Gastrulación en *Drosophila*. **A.** El surco ventral comienza a formarse a medida que se invaginan las células que se encuentran a los lados de la línea media ventral. **B.** Cierre del surco ventral, con las células mesodérmicas colocadas internamente y el ectodermo superficial a los lados de la línea media ventral. **C.** Vista dorsal de un embrión un poco más viejo, que muestra las células polares y el endodermo posterior hundiéndose en el embrión. **D.** Diagrama de una vista dorsolateral de un embrión de *Drosophila* con la extensión completa de la banda germinal, justo antes de la segmentación. El surco cefálico separa la futura región de la cabeza (procéfalo) de la banda germinal, que formará el tórax y el abdomen. **E.** Vista lateral, que muestra la extensión completa de la banda germinal y el comienzo de la segmentación. Sutiles indentaciones marcan los segmentos incipientes a lo largo de la banda germinal: Ma, Mx y Lb corresponden a los segmentos mandibular, maxilar y labial de la cabeza; T1-T3, los segmentos torácicos; A1-A8, los segmentos abdominales. **F.** Banda germinal invirtiendo la dirección. Los segmentos verdaderos ahora son visibles, así como otros territorios de la cabeza dorsal, como el clipeolabrum, la región procefálica, la cresta óptica y la cresta dorsal. **G.** Larva de primer estadio recién salida del huevo. (Fotografías cortesía de F. R. Turner. D, según Campos-Ortega y Hartenstein 1985.)

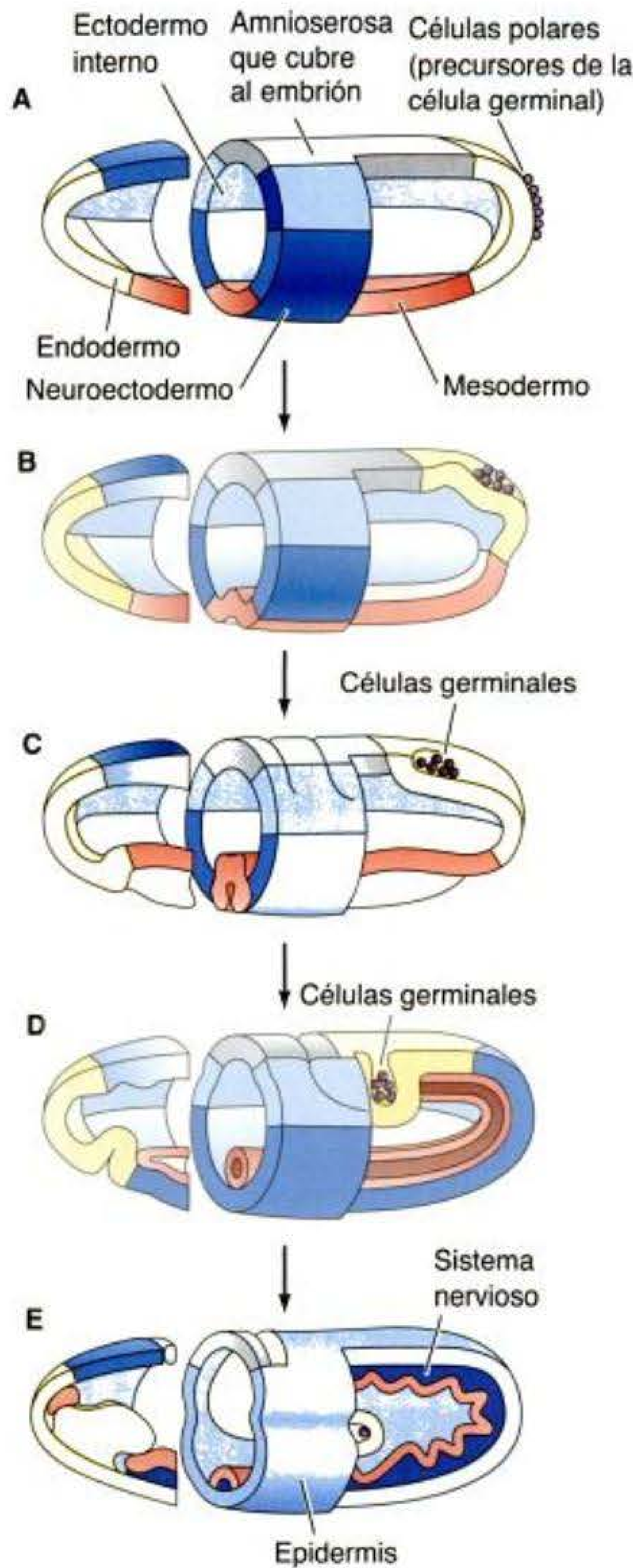


Fig. 9-6. Representación esquemática de la gastrulación en *Drosophila*. **A** y **B** son vistas superficiales y recortadas que muestran los destinos de los tejidos inmediatamente antes de la gastrulación. **C.** Muestra el comienzo de la gastrulación a medida que el mesodermo ventral se invagina en el embrión. **D** corresponde a la figura 9-5A, mientras que **E** corresponde a 9-5B y C. En **E**, el neuroectodermo está en gran parte diferenciado en el sistema nervioso y la epidermis. (Según Campos-Ortega y Hartenstein 1985.)

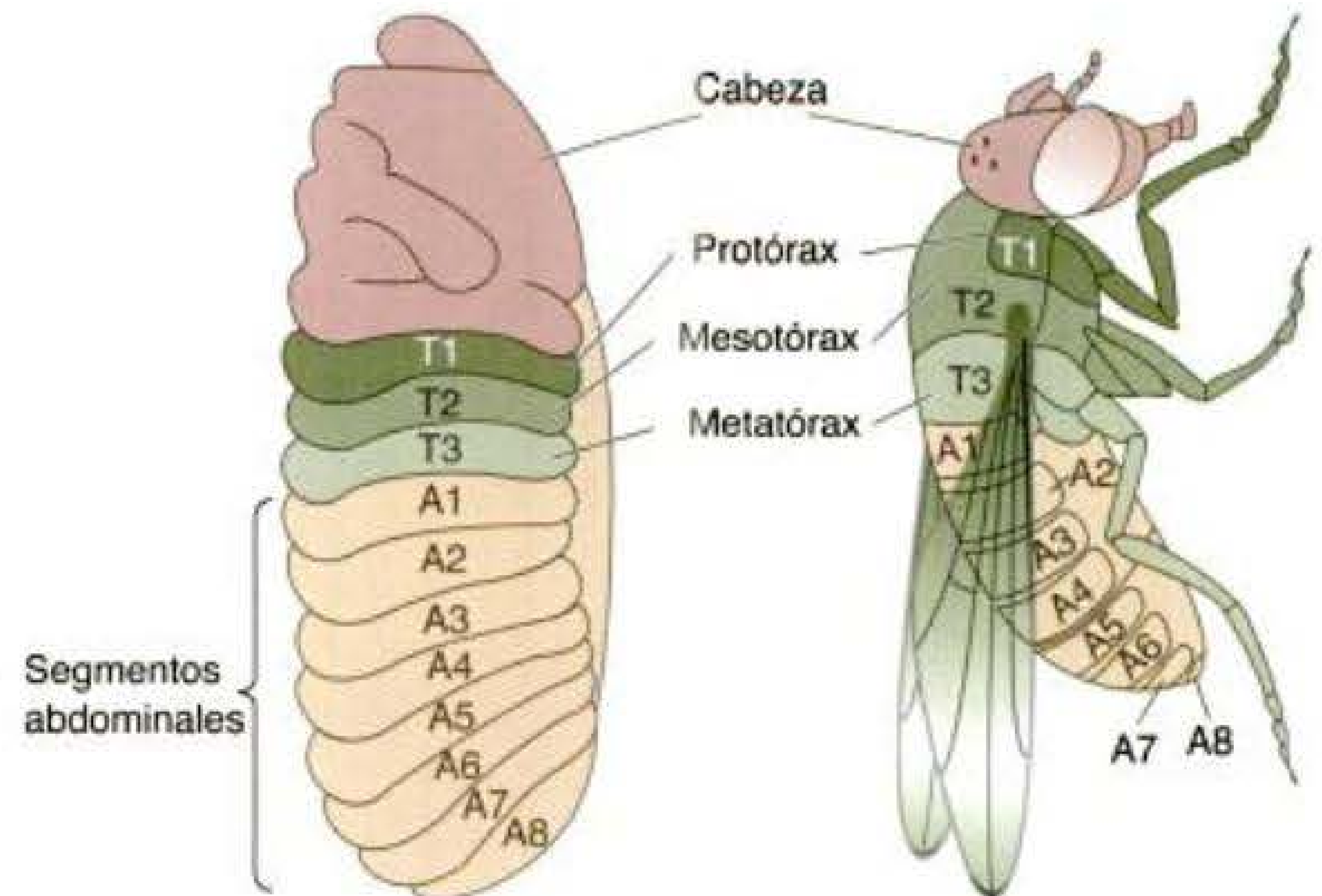


Fig. 9-7. Comparación de la segmentación de la larva y del adulto en *Drosophila*. Los tres segmentos torácicos pueden distinguirse por sus apéndices: T1 (protórax) solo tiene patas; T2 (mesotórax) tiene alas y patas; T3 (metatórax) tiene halterios y patas.

una mitad se desarrollaba en un embrión anterior y una mitad se desarrollaba en un embrión posterior, pero ninguna contenía el segmento medio del embrión. Cuanto más tarde en el desarrollo se efectuara la ligadura, menos segmentos medios estaban ausentes. Por lo tanto, parece que en efecto había gradientes morfogenéticos durante la segmentación provenientes de los dos polos, y que estos gradientes interactúaban para producir información posicional determinando la identidad de cada segmento.

Además, cuando el RNA en la región anterior de los huevos del insecto era destruido (mediante luz ultravioleta o RNasa), los embriones obtenidos carecían de cabeza y de tórax. En su lugar, estos embriones desarrollaban dos abdómenes y dos telson (colas) con simetría en espejo: telson-abdomen-abdomen-telson (fig. 9-9; Kalthoff y Sander 1968; Kandler-Singer y Kalthoff 1976). Por lo tanto, en el laboratorio de Sander se sugirió la existencia de un gradiente en ambos extremos del huevo y se postuló la hipótesis de que el huevo secuestraba un mRNA que generaba un gradiente de material formador anterior.

SITIO WEB 9.4 **Evidencia de gradientes en el desarrollo de los insectos (Evidence for gradients in insect development).** La evidencia original de gradientes en el desarrollo de insectos proviene de estudios que proporcionan evidencia para dos "centros organizadores" en el huevo, uno localizado en el extremo anterior y otro, en el extremo posterior.

El modelo molecular: gradientes de proteína en el desarrollo temprano

En los últimos años de la década de 1980, la hipótesis del gradiente fue unida con un enfoque genético para el estudio de la embriogénesis de *Drosophila*. Si había gradientes, ¿cuáles eran los morfógenos cuyas concentraciones cambiaban sobre el espacio? ¿Cuáles eran los genes que le daban forma a estos gradientes? y estos morfógenos ¿actuaban por activación o por inhibición de ciertos genes en las áreas donde ellos eran concentrados? Christiane Nüsslein-Volhard encabezó un programa de investigación que trató estas preguntas. Los investigadores hallaron que un grupo de genes codificaba morfógenos para la parte anterior del embrión, otro grupo de genes codificaba morfógenos responsables de la organización de

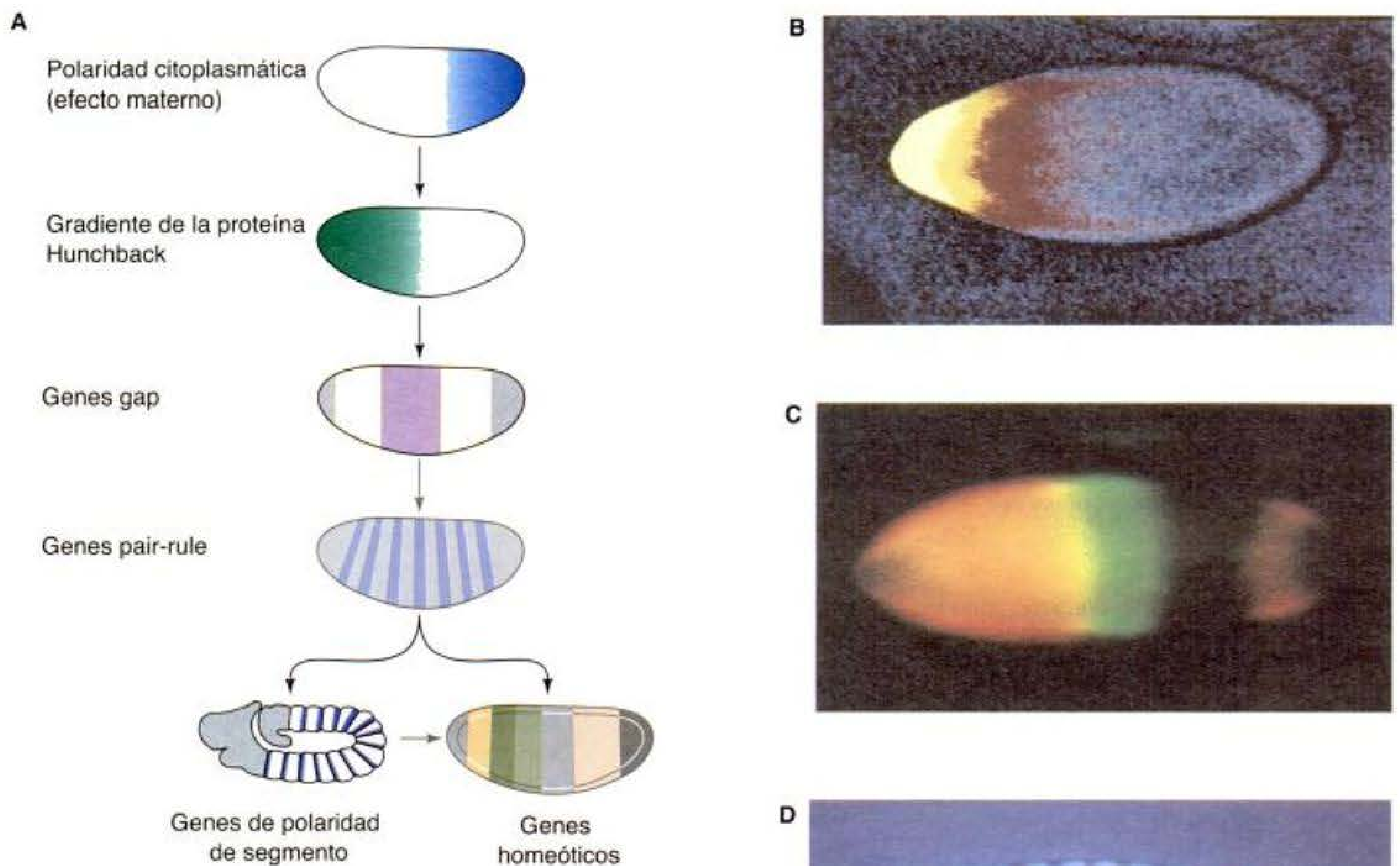


Fig. 9-8. Modelo generalizado de la formación del patrón anteroposterior de *Drosophila*. **A.** El patrón se establece por los genes de efecto materno que forman gradientes y regiones de proteínas morfogenéticas. Estos determinantes morfogenéticos crean un gradiente de la proteína Hunchback que activa diferencialmente a los genes gap, que definen territorios extensos en el embrión. Los genes gap permiten la expresión de los genes pair-rule, cada uno de los cuales divide al embrión en regiones de aproximadamente dos segmentos de ancho. Los genes de polaridad de segmento luego dividen al embrión en unidades segmentadas clasificadas a lo largo del eje anteroposterior. Las acciones de estos genes en conjunto definen los dominios espaciales de los genes homeóticos que definen las identidades de cada uno de los segmentos. En ese sentido, la periodicidad es generada partiendo de una estructura sin periodicidad, y a cada segmento se le otorga una identidad única. **B.** Genes de efecto materno. El eje anteroposterior es especificado por el gradiente de la proteína Bicoid (amarillo hacia el rojo). **C.** Proteína de expresión del gen gap y superposición. El dominio de la proteína Hunchback (naranja) y el dominio de la proteína Krüppel (verde) se superponen para formar una región que contiene ambos factores de transcripción (amarillo). **D.** Los productos del gen pair-rule *fushi tarazu* forman siete bandas a través del embrión. **E.** Los productos del gen de polaridad de segmento *engrailed*, vistos aquí en el estadio de banda germinal extendida. (**B**, cortesía de C. Nüsslein-Volhard; **C**, cortesía de C. Rushlow y M. Levine; **D**, cortesía de T. Karr; **E**, cortesía de S. Carroll y S. Paddock.)

la región posterior del embrión, y un tercer grupo de genes codificaba proteínas que producían las regiones terminales de ambos extremos del embrión (fig. 9-10; cuadro 9-1). En 1955, Nüsslein-Volhard y su colega, Eric Wieschaus, obtuvieron un premio Nobel por este trabajo.

El patrón del eje anteroposterior del embrión de *Drosophila* se establece antes de que incluso comiencen a funcionar los núcleos. Las células nodrizas del ovario depositan mRNA en el ovocito en desarrollo, y estos mRNA son distribuidos a diferentes regiones de la célula. Cuatro RNA mensajeros maternos son críticos para la formación del eje anteroposterior:

- Los mRNA de ***bicoid*** y ***hunchback***, cuyas productos proteicos son críticos para la formación de la cabeza y del tórax
- Los mRNA de ***nanos*** y ***caudal***, cuyos productos proteicos son críticos para la formación de los segmentos abdominales

Los mRNA de *bicoid* están localizados en la porción anterior del gameto femenino sin fecundar, amarrados a los microtúbulos anteriores. Los mensajeros de *nanos* están unidos al citoesqueleto en la región posterior del gameto femenino sin fecundar. Los mRNA de *hunchback* y *cau-*

dal están distribuidos a lo largo de todo el ovocito. Estas distribuciones son llevadas a cabo en el ovocito por los microtúbulos. Las células nodrizas en el extremo anterior de la cámara del huevo sintetizan RNA mensajeros, que viajan por medio del citoesqueleto hacia el ovocito donde son conectados a los microtúbulos por medio de una serie de proteínas motoras.

Los microtúbulos del ovocito temprano de *Drosophila* están organizados por el hecho de que el ovocito mismo está en el compartimento posterior de la cámara del huevo. Aquí, la proteína Gurken del ovocito le dice a las células foliculares terminales que pueden diferenciarse como células foliculares *posteriores* en lugar de *anteriores*. Las células foliculares posteriores responden mediante el envío de una señal que activa a la proteína cinasa A en la membrana celular del ovocito (fig. 9-11; Lane y Kalderon 1994; Roth y col. 1995; González-Reyes y col. 1995). Esta activación hace que cambie la orientación de los microtúbulos. Los extremos de crecimiento ("extremos más") de los microtúbulos ahora señalan hacia el polo *posterior* en lugar de hacerlo hacia las células nodrizas. El mRNA de *bicoid* contiene una secuencia en su 3´UTR que interactúa con las proteínas **Exuperantia** y **Swallow**, el cual amarra sus mensajeros a la proteína dineína que es mantenida en el centro organizador de microtúbulos (el "extremo menos") en la zona anterior del ovocito (Cha y col. 2001). Mientras que el mensajero de *bicoid* está unido al extremo anclado de los microtúbulos mediante una proteína dineína motora, los determinantes posteriores son localizados mediante la proteína motora **cinesina I**, que localiza los extremos de crecimiento de los microtúbulos. Cinesina I se unirá al mRNA *oskar* y a la proteína Staufen. Staufen permite la traducción del

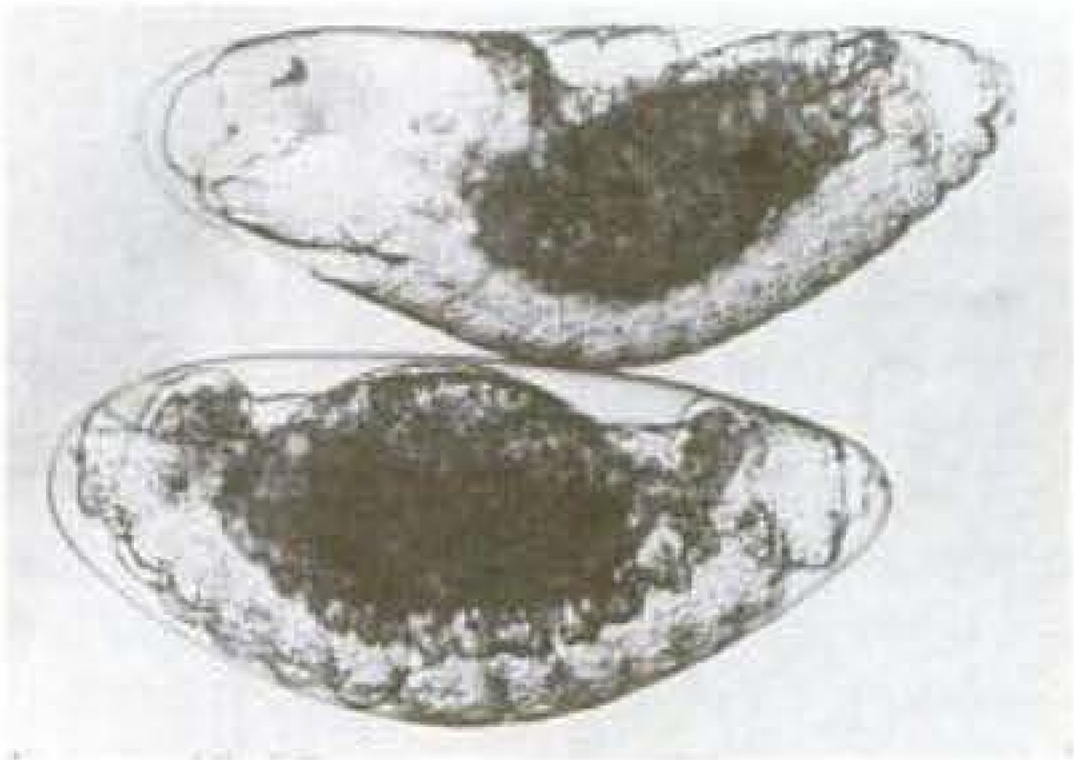


Fig. 9-9. Embriones normales e irradiados del mosquito *Smittia*. El embrión normal (superior) muestra una cabeza sobre la izquierda y segmentos abdominales sobre la derecha. El embrión irradiado con UV (inferior) no tiene región de la cabeza, pero tiene segmentos abdominales en ambos extremos. (De Kalthoff 1969; fotografías cortesía de K. Kalthoff.)

Cuadro 9-1 *Genes de efectores maternos que llevan a cabo la polaridad anteroposterior del embrión de* Drosophila

Gen	*Fenotipo del mutante*	*Función y estructura propuesta*
GRUPO ANTERIOR		
bicoid (*bcd*)	Cabeza y tórax eliminados, reemplazados por telson invertido	Morfógeno clasificado anterior; contiene homeodominios; reprime a caudal
exuperantia (*exu*)	Estructuras anteriores de la cabeza eliminadas	Ancla al mRNA *bicoid*
swallow (*swa*)	Estructuras anteriores de la cabeza eliminadas	Ancla al mRNA *bicoid*
GRUPO POSTERIOR		
nanos (*nos*)	Sin abdomen	Morfógeno posterior; reprime al mRNA de *hunchback*
tudor (*tud*)	Sin abdomen, sin células polares	Localización de la proteína Nanos
oskar (*osk*)	Sin abdomen, sin células polares	Localización de la proteína Nanos
vasa (*vas*)	Sin abdomen, sin células polares; ovogénesis defectuosa	Localización de la proteína Nanos
valois (*val*)	Sin abdomen, sin células polares; celularización defectuosa	Estabilización de la localización del complejo Nanos
pumilio (*pum*)	Sin abdomen	Ayuda a la proteína Nanos a unirse al mensajero *hunchback*
caudal (*cad*)	Sin abdomen	Activa a los genes terminales posteriores
GRUPO TERMINAL		
torso (*tor*)	Sin terminales	Posible morfógeno para los terminales
trunk (*trk*)	Sin terminales	Transmite la señal de Parecida a torso hacia Torso
fs(1) *Nasrat*[*fs*(1)*N*]	Sin terminales; huevos plegados	Transmite la señal de Parecida a torso hacia Torso
fs(1) *polehole*[*fs*(1)*ph*]	Sin terminales; huevos plegados	Transmite la señal de Parecida a Torso hacia Torso

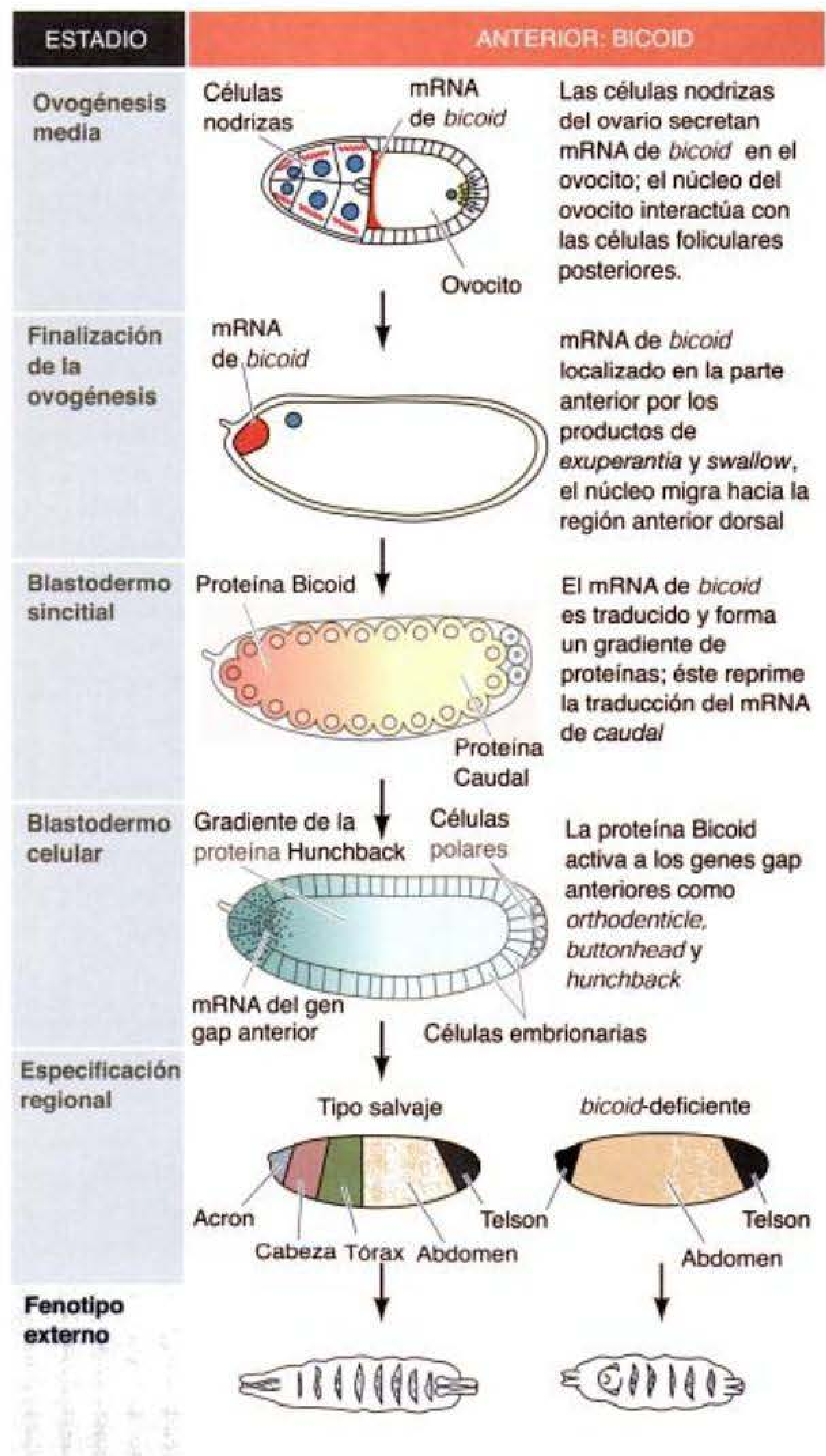
Fuente: Según Anderson 1989.

mensajero *oskar* y la proteína Oskar obtenida es capaz de unir al mensajero *nanos* (Brendza y col. 2000). Por esta razón, al finalizar la ovogénesis, el mensajero *bicoid* es anclado en el extremo anterior del ovocito y el mensajero *nanos* es amarrado al extremo posterior.

Sobre la fecundación, estos mRNA pueden ser traducidos a proteínas. En el polo anterior, el mRNA de *bicoid* es traducido a la proteína Bicoid, que forma un gradiente que es más elevado en el extremo anterior. En el polo posterior, el mensajero *nanos* es traducido a proteína Nanos, que forma un gradiente que es más elevado en el extremo posterior. Bicoid inhibe la traducción del mRNA de *caudal* permitiendo que la proteína Caudal sea sintetizada solamente en la zona posterior de la célula. Contrariamente, la proteína Nanos, junto con la proteína Pumilio, se une al mRNA de *hunchback*, evitando su traducción en la porción posterior del embrión. Bicoid también eleva el nivel de la proteína Hunchback en la parte anterior del embrión mediante la unión a los potenciadores del gen *hunchback* y estimulando su transcripción. El resultado de estas interacciones es la creación de cuatro gradientes de proteínas en el embrión temprano (fig. 9-12):

- Un gradiente anterior-hacia-posterior de la proteína Bicoid
- Un gradiente anterior-hacia-posterior de la proteína Hunchback
- Un gradiente posterior-hacia-anterior de la proteína Nanos
- Un gradiente posterior-hacia-anterior de la proteína Caudal

SITIO WEB 9.5 **Christiane Nüsslein-Volhard y el enfoque molecular del desarrollo (Christiane Nüsslein-Volhard and the molecular approach to development).** La investigación que revolucionó la biología del desarrollo tuvo que esperar por alguien que sintetizara la biología molecular, la embriología y la genética de *Drosophila*.



Las proteínas Bicoid, Hunchback y Caudal son factores de transcripción cuyas concentraciones relativas pueden activar o reprimir genes cigóticos particulares. El estadio ahora está listo para la activación de los genes cigóticos en los núcleos que estaban ocupados dividiéndose mientras este gradiente estaba siendo establecido.

El centro organizador anterior: el gradiente Bicoid

En *Drosophila*, el fenotipo de los mutantes *bicoid* proporciona valiosa información sobre la función de los gradientes morfogenéticos. En vez de tener estructuras anteriores (acron, cabeza y tórax) seguidas por estructuras abdominales y un telson, la estructura del mutante *bicoid* es telson-abdomen-abdomen-telson (fig. 9-13). Parecería que estos embriones carecen de las sustancias que son necesarias para la formación de estructuras anteriores. Además, se puede postular la hipótesis de que la sustancia de la que estos mutantes carecen es una postulada por Sander y Kalthoff para encender los genes para las estructuras anteriores y apagar los genes para las estructuras del telson (compárense figs. 9-9 y 9-13).

Estudios posteriores han fortalecido la visión de que el producto del gen *bicoid* tipo salvaje es el morfógeno que controla el desarrollo anterior. En primer lugar, *bicoid* es un gen de efecto materno. El RNA mensajero de los genes *bicoid* de la madre es colocado en el embrión por las células del ovario de la madre (véase fig. 9-11B; Frigerio y col. 1986; Berleth y col. 1988). El mRNA de *bicoid* está estrictamente localizado en la porción anterior del ovocito (fig. 9-14A), en donde el citoesqueleto anterior lo ancla a éste mediante la región 3' sin traducir del mensajero (Ferrandon y col. 1997; Macdonald y Kerr 1998). Este mRNA está latente hasta la fecundación, momento en el que recibe una larga cola de poliadenilato y puede ser traducido. Driever y Nüsslein-Volhard (1988b) han demostrado que cuando la proteína *Bicoid* es traducida desde su RNA durante la segmentación temprana, forma

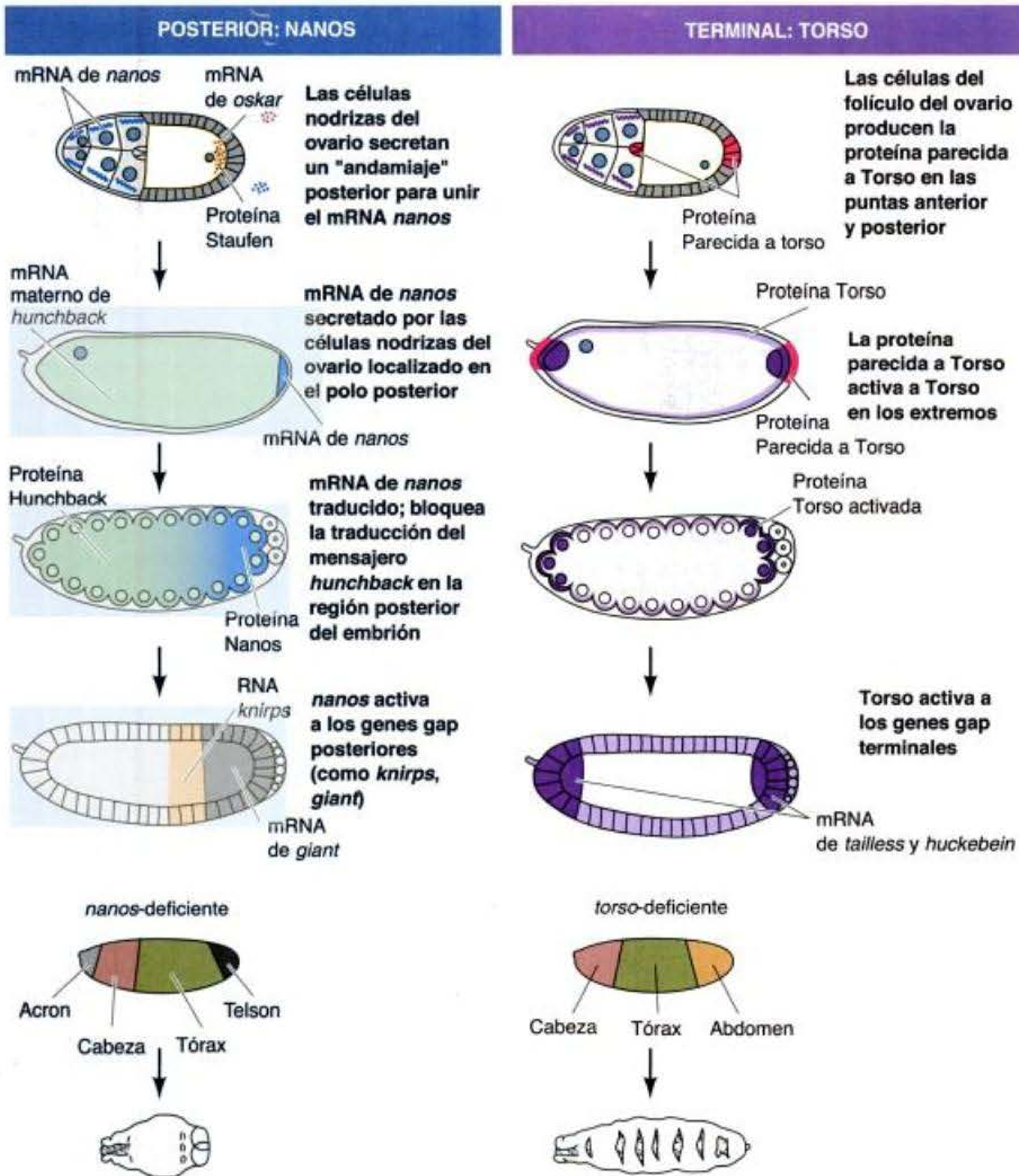
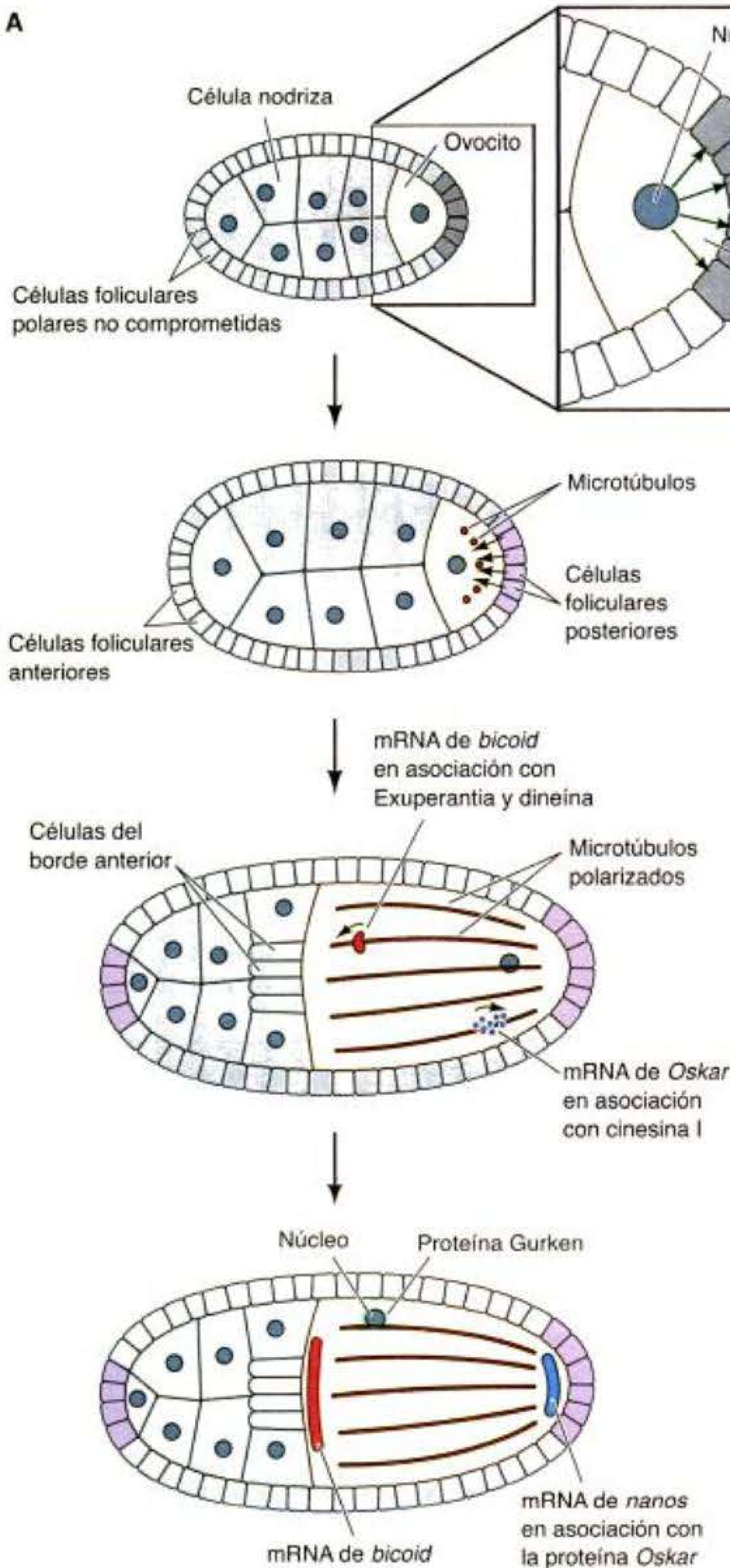


Fig. 9-10. Tres vías genéticas independientes interactúan para formar el eje anteroposterior del embrión de *Drosophila*. En cada caso, la asimetría inicial se establece durante la ovogénesis y el patrón es organizado por proteínas maternas poco después de la fecundación. La realización del patrón se produce cuando las proteínas maternas localizadas activan o reprimen genes cigóticos específicos en diferentes regiones del embrión. (Según St. Johnston y Nüsslein-Volhard 1992.)

un gradiente, con la concentración más elevada en el extremo anterior del huevo y más baja en el tercio posterior del huevo. Además, esta proteína llega a estar concentrada rápidamente en los núcleos embrionarios en la porción anterior del embrión (fig. 9-13C-E; véase además fig. 5-35).

SITIO WEB 9.6 **Mecanismos de localización del mRNA de *bicoid* (Mechanism of *bicoid* mRNA localization).** Una de las etapas más críticas en la formación de patrones de *Drosophila* es la unión del mRNA *bicoid* a los microtúbulos anteriores. Varios genes están involucrados en este proceso, por medio del cual el mensajero de *bicoid* forma un complejo con varias proteínas.

Evidencias adicionales que indican que la proteína Bicoid es el morfógeno anterior provienen de experimentos que alteraron la pendiente del gradiente. Como se ha visto, los genes *exuperantia* y *swallow* (tragar) son responsables de mantener al mensajero *bicoid* en el polo anterior del huevo (ovocito). Las proteínas Exuperantia y Swallow parecen unir el mensajero de *bicoid* a la dineína ATPasa sobre los microtúbulos, permitiendo que el mRNA de *bicoid* viaje sobre los microtúbulos hacia la corteza anterior del huevo (ovocito) (Schnorrer y col. 2000; Cha y col. 2001). Cuando estas proteínas están ausentes, el mensajero de *bicoid* se difunde más lejos hacia la parte posterior del huevo y el gradiente de la proteína Bicoid es menos pronunciado (Driever y Nüsslein-Volhard 1988a). El fenotipo producido por los mutantes de *exuperantia* y *swallow* es similar al de los embriones deficientes de *bicoid*, pero menos severo. Estos embriones carecen de sus estructuras más anteriores y tienen una boca y una región torácica más extensa. Por lo tanto, mediante la alteración del gradiente de la proteína Bicoid, como consecuencia se modifica el destino de las regiones embrionarias.



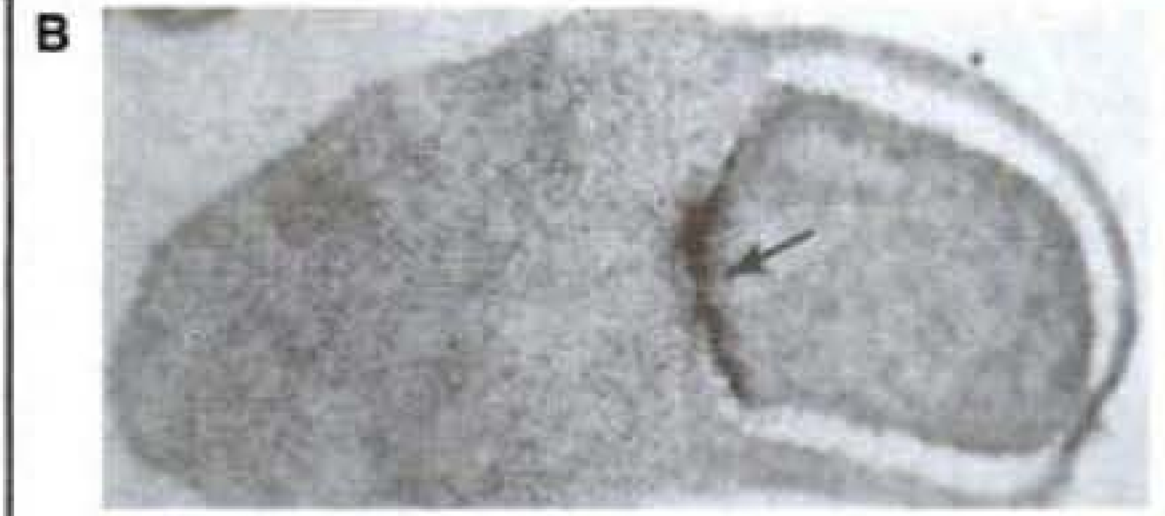


Fig. 9-11. Especificación del eje anteroposterior del embrión de *Drosophila* durante la ovogénesis. **A.** El ovocito se mueve hacia la región posterior de la cámara del huevo, mientras que las células nodrizas ocupan la parte anterior. El núcleo del ovocito se mueve hacia las células foliculares terminales y sintetiza la proteína Gurken (verde). Las células foliculares terminales tienen receptores para la proteína Gurken; cuando esta última se une a los receptores, las células se diferencian en células foliculares posteriores. Las células foliculares posteriores responden sintetizando una molécula que activa a la proteína cinasa A en el ovocito. La proteína cinasa A orienta a los microtúbulos de modo tal que el extremo en crecimiento está en la región posterior. El *mensajero* de *bicoid* se une a la dineína, una proteína motora asociada al extremo que no crece de los microtúbulos. La dineína mueve el *mensajero* de *bicoid* hacia el extremo anterior del huevo (ovocito). El mensajero de *oskar* forma un complejo con cinesina I, una proteína motora que mueve a éste hacia el extremo en crecimiento de los microtúbulos en la región posterior, donde la proteína Oskar puede unirse al *mensajero* de *nanos*. El núcleo (y su proteína Gurken) migra por los microtúbulos e induce a las células foliculares adyacentes a convertirse en células foliculares dorsales. **B.** Microfotografía que muestra el mRNA de *bicoid* (teñido de negro) pasando desde las células nodrizas hacia el ovocito (flecha) durante la ovogénesis. (**B**, de Stephanson y col. 1988; fotografía cortesía de los autores.)

La confirmación de que la proteína Bicoid es decisiva para dar inicio a la formación de la cabeza y del tórax proviene de experimentos en los cuales fue inyectado mRNA de *bicoid* purificado en embriones en segmentación temprana (fig. 9-15; Driever y col. 1990). Cuando los embriones deficientes de *bicoid* (cuyas madres carecían de genes *bicoid*) fueron inyectados en la parte anterior, el mRNA de *bicoid* rescató a los embriones e hizo que ellos tuvieran una polaridad anteroposterior normal. Además, cualquiera que fuera el sitio en el que se inyectaba el mensajero de *bicoid* éste llegaba a ser la cabeza. Si el mRNA de *bicoid* era inyectado en el centro de un embrión, la región media se transformaba en la cabeza y las regiones a cada lado de ésta se convertían en estructuras del tórax. Si se inyectaba una gran cantidad de mRNA de *bicoid* en el extremo posterior de un embrión tipo salvaje (con su propio mensajero de *bicoid* endógeno en su polo anterior), aparecían dos cabezas, una sobre cada extremo.

Entonces surgió la siguiente pregunta: ¿cómo podría un gradiente de la proteína Bicoid controlar la determinación del eje anteroposterior? Evidencia reciente sugiere que Bicoid actúa de dos modos para especificar la región anterior del embrión de *Drosophila*. En primer lugar, actúa como un represor para la formación de región posterior. Esto lo hace al unirse y suprimir la traducción del mRNA de *caudal*, que se halla en todas las regiones del huevo y en el embrión temprano. La proteína Caudal es decisiva en la especificación de los dominios de la región posterior del embrión y activa a los genes responsables de la invaginación del intestino posterior (Wu y Lengyel 1998). Bicoid se une a una región específica de la región 3' sin traducir del mensajero de *caudal*, evitando de este modo la traducción de este mensajero en el sector anterior del embrión (fig. 9-16; Chan y Struhl 1997; Rivera-Pomar y col. 1996; Niessing y col. 2000). Esta supresión es necesaria, ya que si la proteína Caudal es producida en la región anterior, no se forman apropiadamente la cabeza y el tórax.

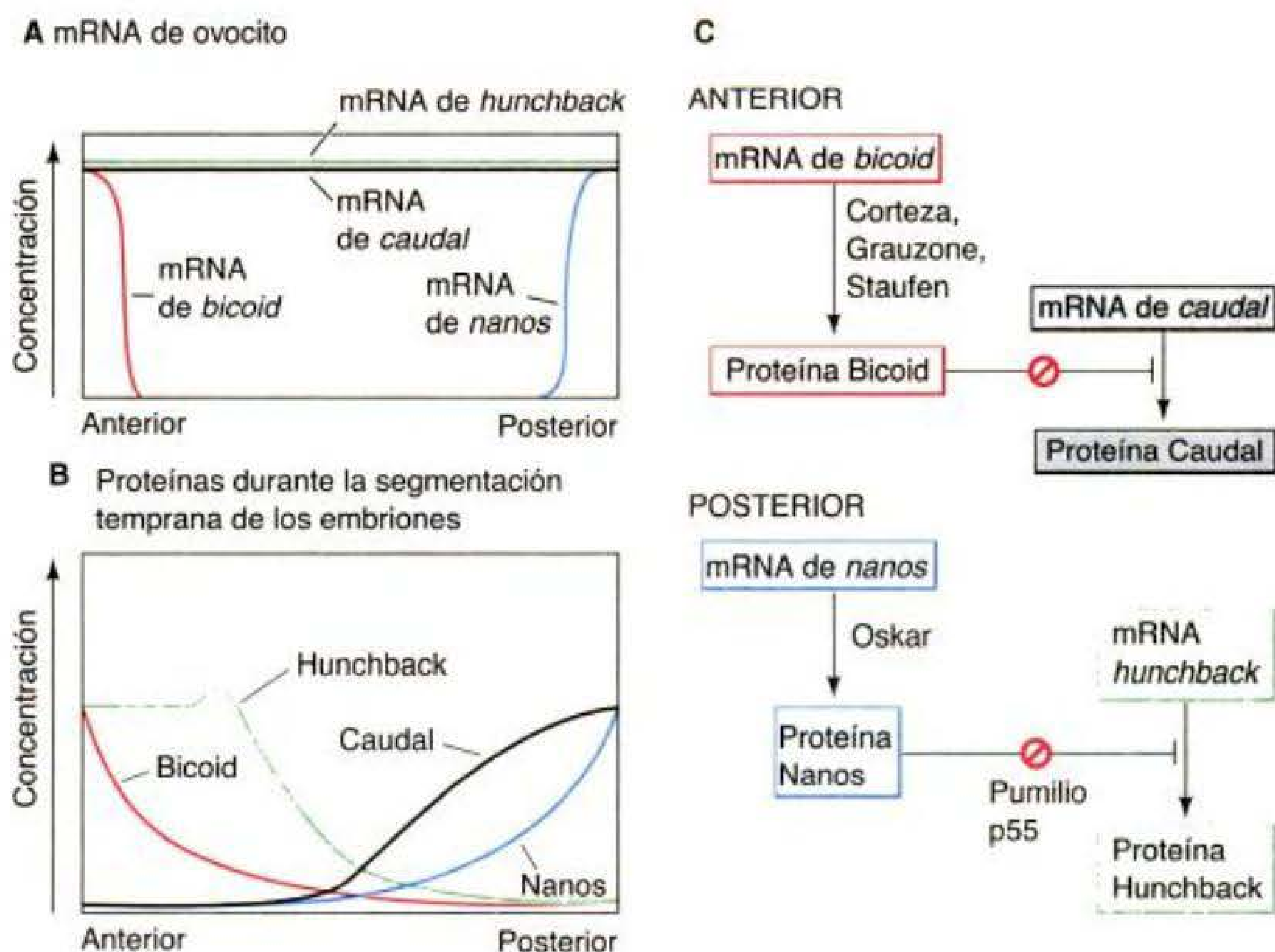


Fig. 9-12. Un modelo de la generación del patrón anteroposterior por los genes de efecto materno de *Drosophila*. **A.** Los RNA mensajeros de *bicoid, nanos, hunchback* y *caudal* son colocados en el ovocito por las células nodrizas del ovario. El *mensajero* de *bicoid* es secuestrado en la región anterior; el *mensajero nanos* es enviado al polo posterior. **B.** En el momento de la traducción, el gradiente de la proteína Bicoid se extiende desde anterior hacia posterior, mientras que el gradiente de la proteína Nanos se extiende desde posterior hacia anterior. Nanos inhibe la traducción del mensajero de *hunchback* (en la parte posterior), mientras que Bicoid evita la traducción del mensajero de *caudal* (en la parte anterior). Esta inhibición da como resultado gradientes opuestos de Caudal y Hunchback. El gradiente de Hunchback es reforzado secundariamente por la transcripición del gen *hunchback* en los núcleos anteriores (debido a que Bicoid actúa como un factor de transcripción para activar la transcripción *hunchback*). **C.** Interacciones paralelas mediante las cuales la regulación de la traducción del gen establece el patrón anteroposterior del embrión de *Drosophila*. (C, según Macdonald y Smibert 1996.)

En segundo lugar, la proteína Bicoid funciona como un factor de transcripción. Bicoid ingresa en los núcleos de los embriones en segmentación temprana, en donde activa al gen *hunchback*. La transcripción de *hunchback* se observa solamente en la mitad anterior del embrión, la región donde se encuentra Bicoid. Los mutantes deficientes de la proteína Hunchback materna y cigótica carecen de partes de la boca y de estructuras del tórax. En los últimos años de la década de 1980, dos laboratorios de manera independiente demostraron que Bicoid se une y activa al gen *hunchback* (Driever y Nüsslein-Volhard 1989; Struhl y col. 1989). El mRNA de *hunchback* está presente inicialmente en todo el embrión, aunque puede producirse una mayor cantidad a partir de los núcleos del cigoto si son activados por Bicoid. La proteína Hunchback derivada de la síntesis de nuevo mRNA de *hunchback* se suma al Hunchback ya sintetizado por la traducción de los mensajeros maternos en la parte anterior del embrión. Hunchback también es un factor de transcripción que reprime a los genes específicos del abdomen, permitiendo de este modo que la región de expresión de *hunchback* forme la cabeza y el tórax.

Hunchback también actúa con Bicoid para generar el patrón anterior del embrión. De acuerdo con dos partes de evidencias, Driever y col. (1989) predijeron que Bicoid debe activar al menos a otro gen anterior además de *hunchback*. En primer lugar, las eliminaciones de *hunchback* producen solo algunos de los defectos vistos en el fenotipo mutante de *bicoid*. En segundo lugar, los experimentos de *swallow* y *exuperantia* demostraron que solo son necesarios niveles moderados de la proteína Bicoid para activar la formación del tórax (es decir, la expresión del gen *hunchback*), pero la formación de la cabeza requiere altas concentraciones de Bicoid. Driever y col. (1989) predijeron que los promotores de un gen gap específico de la cabeza deberían tener sitios de unión de baja afinidad para Bicoid, de modo tal que este gen pu-

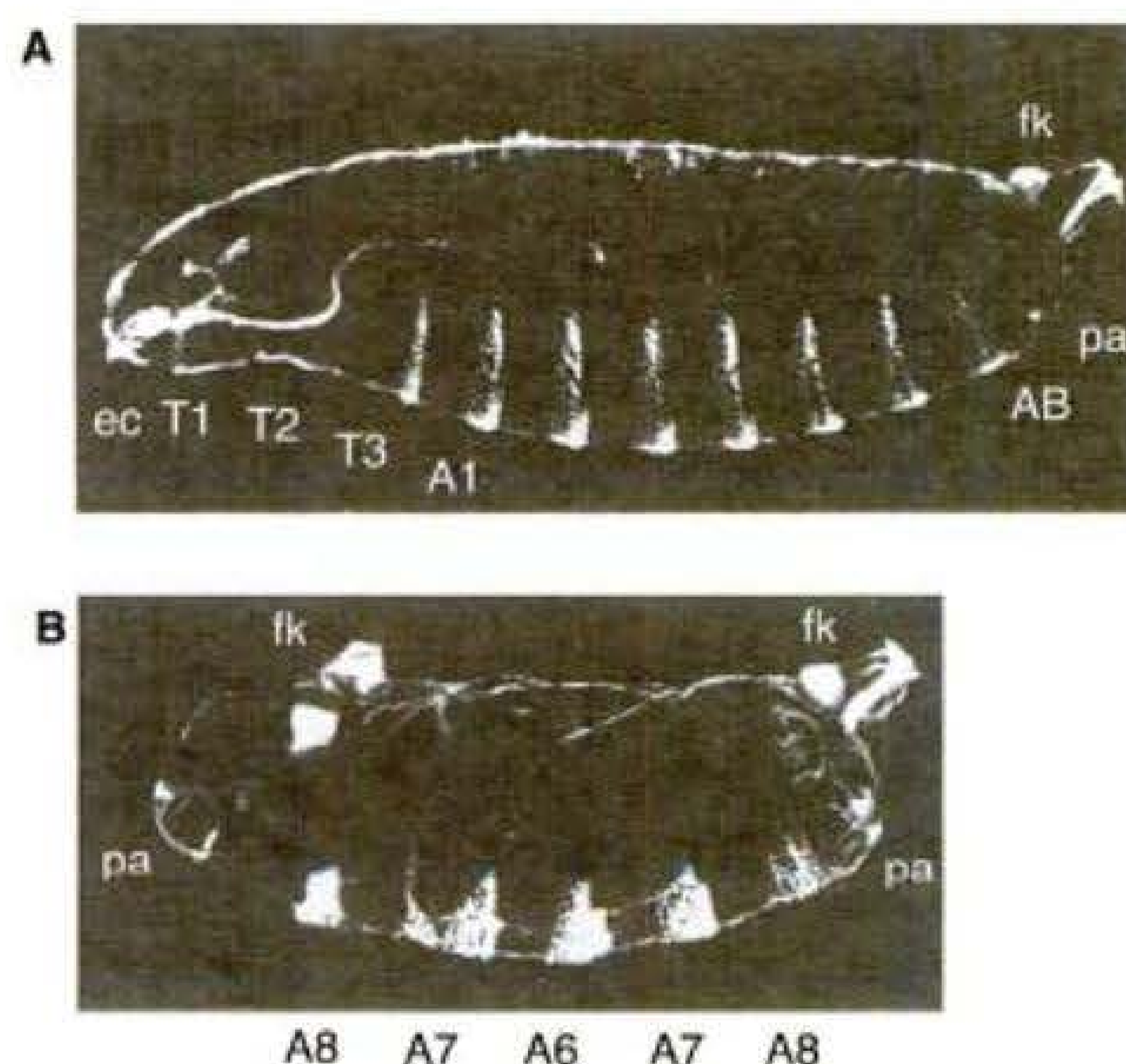


Fig. 9-13. Fenotipo de un embrión fuertemente afectado de una mosca hembra deficiente del gen *bicoid*. **A.** Patrón de la cutícula del tipo salvaje. **B.** Mutante *bicoid*. La cabeza y el tórax han sido reemplazados por un segundo grupo de estructuras del telson posteriores. Abreviaturas: fk, neuronas de filzkörper; pa, placas anales (ambas son estructuras del telson); T1-T3, segmentos torácicos; A1, A8, los dos segmentos abdominales terminales; ec, estructuras de la cabeza. (De Driever y col. 1990; fotografías cortesía de W. Driever.)

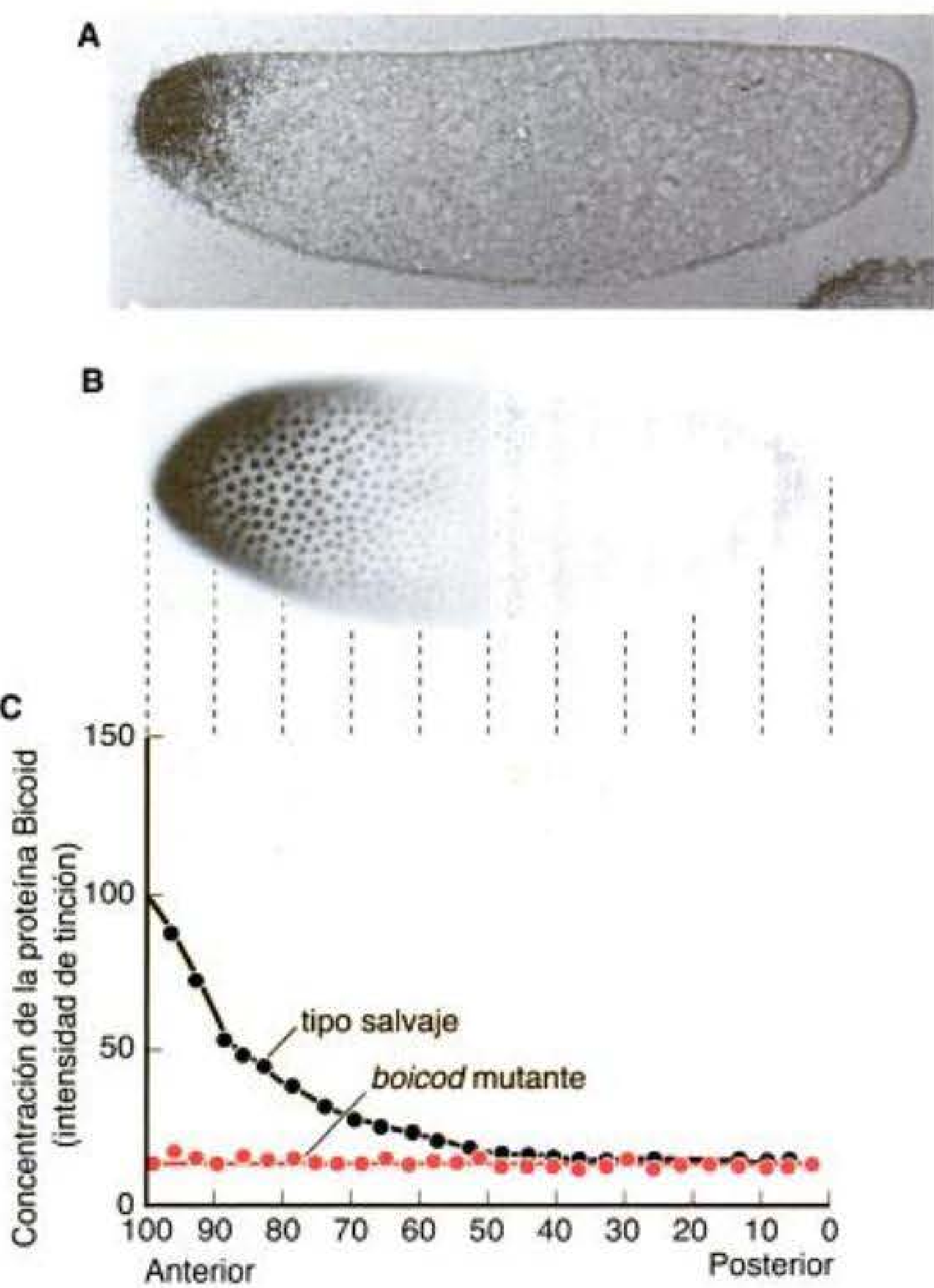


Fig. 9-14. Gradiente de la proteína Bicoid en el embrión temprano de *Drosophila*. **A.** Localización del mRNA de *bicoid* en la punta anterior del embrión. **B.** Gradiente de la proteína Bicoid poco después de la fecundación. Nótese que la concentración en la parte anterior es la más elevada y va disminuyendo hacia la región posterior. Nótese además que Bicoid está concentrada en los núcleos. **C.** Densitometría de barrido del gradiente de la proteína Bicoid. La curva superior representa al gradiente de Bicoid en los embriones tipo salvaje. La curva inferior representa a Bicoid en los embriones de las madres mutantes de *bicoid*. (**A**, de Kaufman y col. 1990; **B** y **C**, de Driever y Nüsslein-Volhard 1988b; fotografías cortesía de los autores.)

diera ser activado solo en concentraciones extremadamente altas de Bicoid –esto es, cerca del extremo anterior del embrión. Desde entonces, han sido descubiertos tres genes gap de la cabeza que para su expresión son dependientes de concentraciones muy altas de Bicoid (Cohen y Jürgens 1990; Finkelstein y Perrimon 1990; Grossniklaus y col. 1994). Los genes *buttonhead, empty spiracles* y *orthodenticle* especifican progresivamente la región anterior de la cabeza. Además de necesitar altos niveles de Bicoid para la activación, estos genes también requieren la presencia de la proteína Hunchback para ser transcriptos (Simpson-Brose y col. 1994; Reinitz y col. 1995). Las proteínas Bicoid y Hunchback actúan de manera sinérgica como potenciadotes de estos "genes de la cabeza" para promover su transcripción.*

El centro organizador posterior: localización y activación de nanos

El centro organizador posterior es definido por las actividades del gen *nanos* (Lehmann y Nüsslein-Volhard 1991;

* *Bicoid* parece ser un gen relativamente "nuevo" que evolucionó en las moscas pero que no es hallado en otros insectos. El determinante anterior de estos otros grupos de insectos todavía no ha sido encontrado pero parece tener propiedades parecidas a las de *bicoid* (Wolff y col. 1998; Brown y col. 2001).

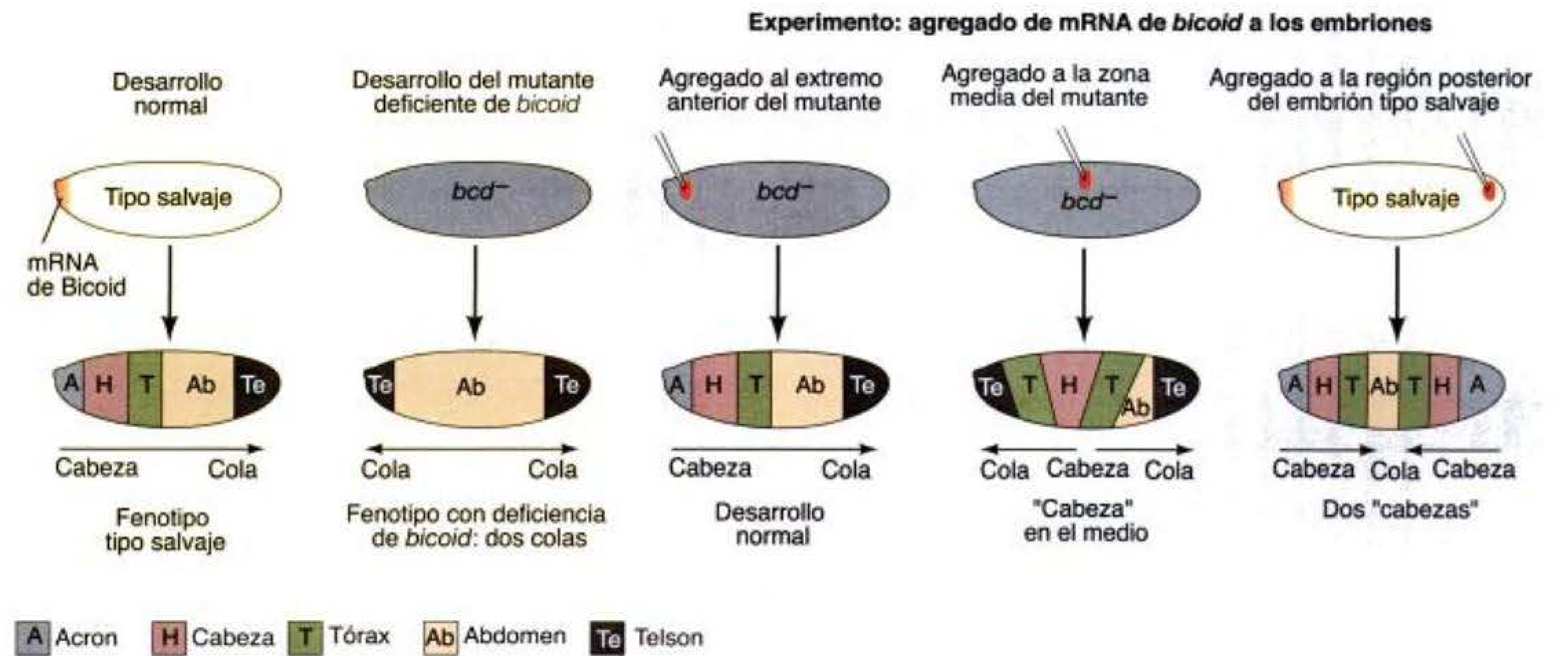


Fig. 9-15. Representación esquemática de experimentos que demuestran que el gen *bicoid* codifica el morfógeno responsable para las estructuras de la cabeza en *Drosophila*. Los fenotipos de los embriones deficientes de *bicoid* y de los de tipo salvaje se muestran a la izquierda. Cuando embriones deficientes de *bicoid* son inyectados con mRNA de *bicoid*, el punto de inyección forma las estructuras de la cabeza. Cuando el polo posterior de un embrión tipo salvaje durante la segmentación temprana es inyectado con el mRNA de *bicoid*, se forman las estructuras de la cabeza en ambos polos. (Según Driever y col. 1990.)

Wang y Lehmann 1991; Wharton y Struhl 1991). El RNA de *nanos* es producido por las células nodrizas del ovario y es transportado a la región posterior del huevo (ovocito) (más lejos de las células nodrizas). El mensajero de *nanos* se une al citoesqueleto en la región posterior del ovocito a través del 3' UTR y se asocia con los productos de varios genes (*oskar, valois, vasa, staufen y tudor*).* Si *nanos* o cualquier otro de estos genes de efecto materno están ausentes en la madre, no se forma el abdomen del embrión (Lehmann y Nüsslein-Volhard 1986; Schüpbach y Wieschaus 1986).

El mensajero de *nanos* está inactivo en el ovocito sin fecundar debido a que es reprimido por la unión de la proteína Smaug a su 3' UTR (Smibert y col. 1996). Durante la fecundación, se elimina esta represión en el polo posterior del embrión, probablemente a través de la proteína Oskar, y como consecuencia Nanos puede ser sintetizada (Bergsten y Gavis 1999; Dahanukar y col. 1999). La proteína Nanos forma un gradiente que es más elevado en el extremo posterior. Nanos funciona mediante la inactivación de la traducción del mRNA de *hunchback* (fig. 9-17; véase además fig. 9-12; Tautz 1988). En la parte anterior del embrión en estadio de segmentación, el mensajero de *hunchback* se une por su 3' UTR a la proteína Pumilio y el mensajero puede ser traducido a proteína Hunchback. Sin embargo, en la parte posterior del embrión temprano la proteína Pumilio adherida puede ser unida por Nanos. Nanos se une a Pumilio y deadenila el mRNA de *hunchback*, evitando su traducción (Barker y col. 1992; Wreden y col. 1997). Por lo tanto, la combinación de las proteínas Bicoid y Nanos causa un gradiente de Hunchback a través del huevo (ovocito). Bicoid activa la transcripción del gen *hunchback* en la parte anterior del embrión, mientras que Nanos inhibe la traducción del mRNA de *hunchback* en la parte posterior del embrión.

El grupo del gen terminal

Además de los morfógenos anteriores y posteriores, hay un tercer grupo de genes maternos cuyas proteínas generan las extremidades no segmentadas del eje anteroposterior: el **acron** (la porción terminal de la cabeza que incluye el cerebro) y el **telson** (la cola). Las mutaciones en estos genes terminales dan como resultado la pérdida del acron y de los segmentos más anteriores de la cabeza así como del telson y de los segmentos abdominales más posteriores (Degelmann y col. 1986; Klinger y col. 1988). Un gen crítico aquí parece ser ***torso***, un gen que codifica un receptor de tirosina cinasa. Los embriones de las madres con mutaciones de *torso* no tienen acron ni telson, lo que sugiere que los dos terminales del embrión son formados mediante la misma vía. El mRNA de *torso* es sintetizado por las células del ovario, depositado en el ovocito y traducido después de la fecundación. La proteína de transmembrana Torso no está restringida espacialmente a los extremos del huevo (ovocito), sino que está distribuida uniformemente a lo largo de la membrana plasmática (Casanova y Struhl 1989). En efecto, una mutación dominante de *torso*, que confiere actividad constitutiva al receptor, convierte la totalidad de la mitad anterior del embrión en acron y la totalidad de la mitad posterior en telson. Por lo tanto, Torso normalmente debe activarse solo en los extremos del huevo (ovocito).

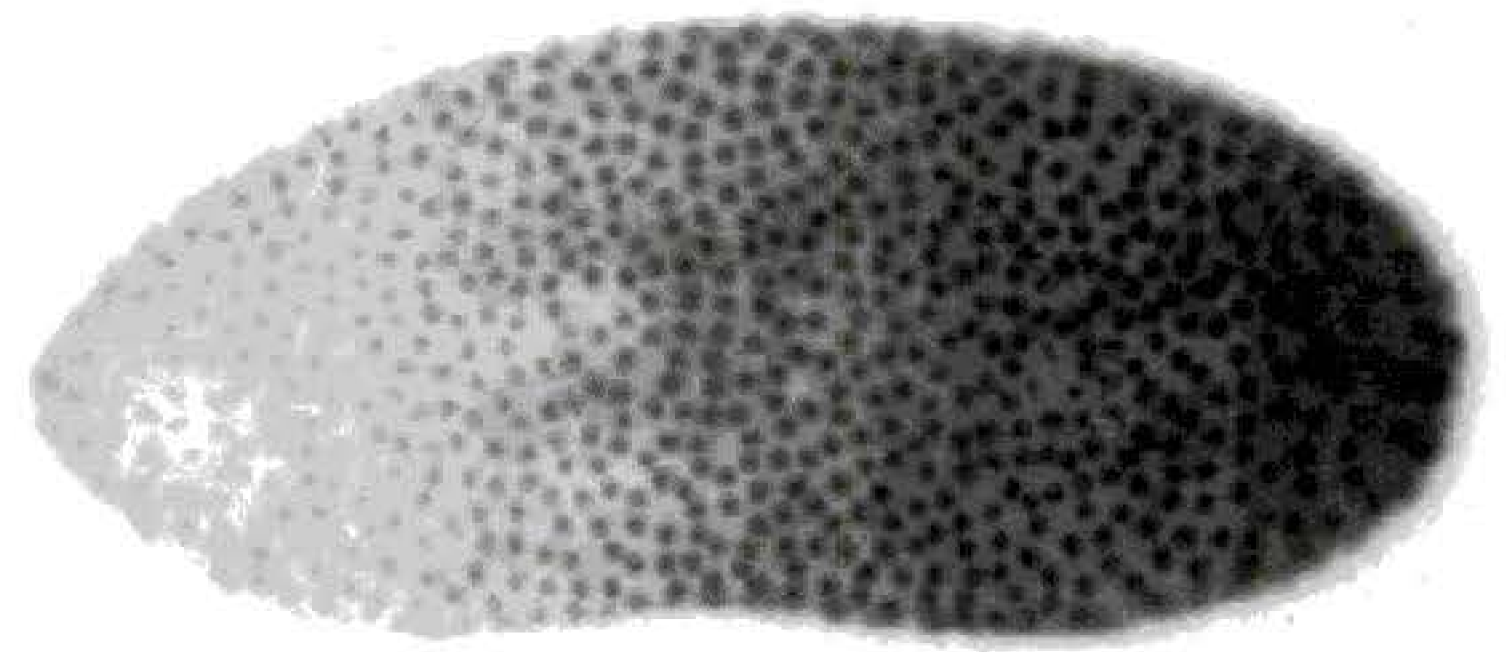


Fig. 9-16. Gradiente de la proteína Caudal en el blastodermo sincitial de un embrión de *Drosophila* tipo salvaje. La proteína (teñida de oscuro) ingresa en los núcleos y ayuda a especificar el destino posterior. Compárese con el gradiente complementario de la proteína Bicoid en la figura 9-14. (De Macdonald y Struhl 1986; fotografía cortesía de los autores.)

Stevens y col. (1990) han demostrado que este es el caso. La proteína Torso es activada por las células foliculares solamente en los dos polos del ovocito. Dos partes de evidencia sugieren que el activador de Torso es probablemente la proteína **tipo torso**: en primer lugar, las mutaciones de pérdida de función en el gen *tipo torso* crean un fenotipo casi idéntico al producido por los mutantes *torso*; y en segundo lugar, la expresión ectópica de la proteína tipo torso activa a Torso en la nueva localización. El gen *tipo torso* es expresado generalmente sólo en las células foliculares anteriores y posteriores y la proteína secretada tipo torso puede atravesar el espacio perivitelino para activar a Torso en la membrana del ovocito (Martin y col. 1994; Furriols y col. 1998). De este modo, tipo torso activa a Torso en las regiones anterior y posterior de la membrana del ovocito.

Los productos finales de la cascada del RTK cinasa activados por Torso difunden hacia el citoplasma en ambos extremos del embrión (fig. 9-18; Gabay y col. 1997; véase además cap. 6). Se piensa que estas cinasas inactivan a la proteína Groucho, un inhibidor transcripcional de los genes gap *tailless* y *huckebein* (Paroush y col. 1997); son estos dos genes gap los que especifican los terminales del embrión. La distinción entre el terminal anterior y el posterior depende de la presencia de Bicoid. Si *tailless* y

* Como sucede en el caso de la colocación del mensajero *bicoid*, la localización del mensajero de *nanos* está determinada por la región 3' sin traducir. Si el 3' UTR de *bicoid* es colocado experimentalmente sobre el mRNA de *nanos* en la región codificadora de la proteína, el mensajero de *nanos* consigue colocarse en la región anterior del huevo. Cuando el RNA es traducido, la proteína Nanos inhibe la traducción de los mRNA de *hunchback* y *bicoid*, y el embrión forma dos abdómenes: uno en la parte anterior del embrión y otro en la parte posterior (Gavis y Lehmann 1992). Curiosamente, mucho, si no la mayoría, del mensajero de *nanos* se mantiene normalmente en la región no polar del huevo. Sin embargo, careciendo de las proteínas Oskar y Stufen, éste no puede ser traducido durante la fecundación (Brendza y col. 2000). Se verán estas proteínas otra vez en el capítulo 19, debido a que son críticas en la formación de la línea germinal de *Drosophila*.

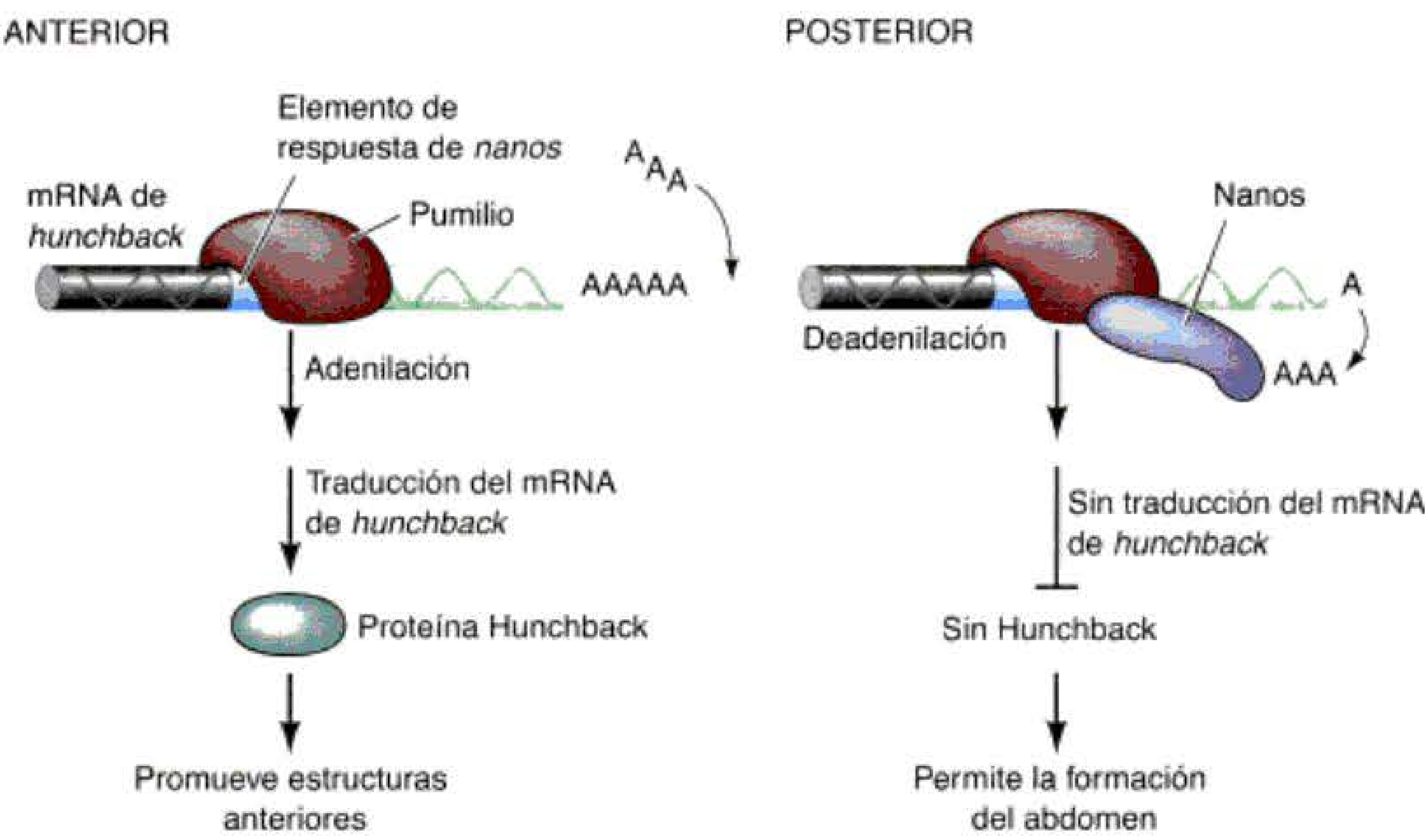


Fig. 9-17. Control de la traducción del mRNA de *hunchback* mediante la proteína Nanos. En la parte anterior del embrión, la proteína Pumilio se une al elemento de respuesta de Nanos (NRE; del inglés, *Nanos response element*) en el 3' UTR del *mensajero* de *hunchback*, y el *mensajero* es poliadenilado normalmente. Este *mensajero* poliadenilado puede ser traducido en la proteína Hunchback. En la parte posterior del embrión, donde se encuentra la proteína Nanos, Nanos se une a Pumilio para provocar la deadenilación del *mensajero* de *hunchback* e impedir de este modo su traducción. (Según Wreden y col. 1997.)

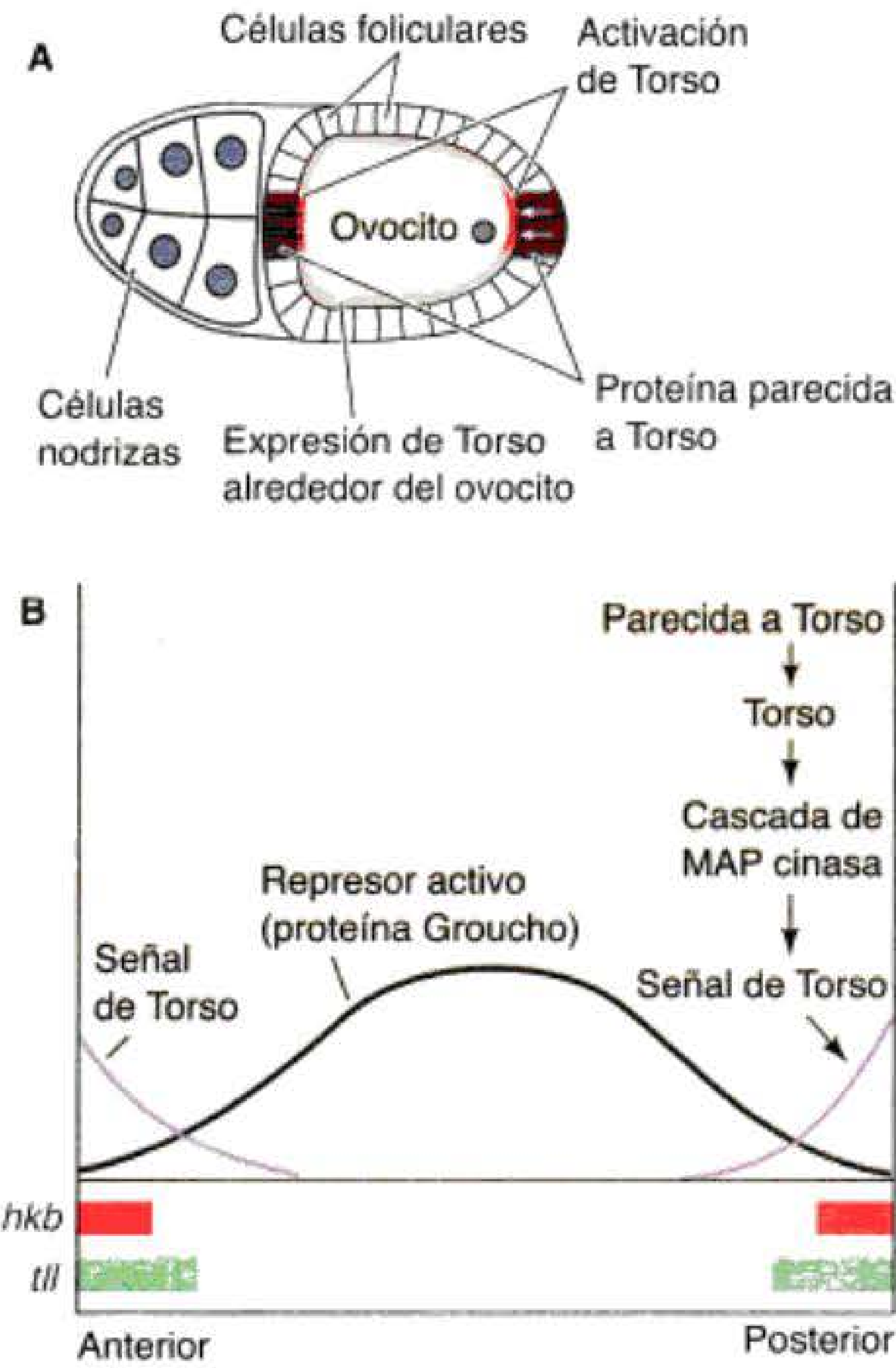


Fig. 9-18. Formación de extremidades sin segmentar por la señal de *torso*. **A.** La proteína Parecida a torso es expresada por las células foliculares en los polos del ovocito. La proteína Torso es expresada alrededor de la totalidad del ovocito. La proteína Parecida a torso activa a Torso en los polos (véase Casanova y col. 1995). **B.** Inactivación de la supresión de la traducción de los genes *huckebein* (*hkb*) y *tailless* (*tll*). La señal de Torso antagoniza a la proteína Groucho. Groucho actúa como un represor de la expresión de *tailless* y de *huckebein*. Se piensa que el gradiente de Torso proporciona la información que le permite a *tailless* expresarse más lejos en el embrión que *huckebein*. (**A**, según Gabay y col. 1997; **B**, según Paroush y col. 1997.)

huckebein actúan solos, la región terminal se diferencia a telson. Sin embargo, si Bicoid está también presente, la región terminal forma un acron (Pignoni y col. 1992).

El eje anteroposterior del embrión es por consiguiente especificado por tres grupos de genes: 1) aquellos que definen el centro organizador anterior, 2) aquellos que definen el centro organizador posterior y 3) aquellos que definen la región limítrofe terminal. El centro organizador anterior está localizado en el extremo anterior del embrión y actúa a través de un gradiente de la proteína Bicoid que funciona como un factor de transcripción para activar a los genes gap específicos anteriores y como un represor de la traducción para suprimir a los genes gap específicos posteriores. El centro organizador posterior está localizado en el polo posterior y actúa traduccionalmente a través de la proteína Nanos para inhibir la formación anterior y transcripcionalmente a través de la proteína Caudal para activar los genes que forman el abdomen. La activación de aquellos genes responsables de la construcción de la parte posterior es llevada a cabo por Caudal, una proteína cuya síntesis (como se ha visto antes) es inhibida en la parte anterior del embrión. Los límites del acron y del telson son definidos por el producto del gen *torso*, que es activado en los extremos del embrión.

La siguiente etapa en el desarrollo será el uso de estos gradientes de factores de transcripción para activar a genes específicos a lo largo del eje anteroposterior.

Los genes de segmentación

El proceso de compromiso del destino celular en *Drosophila* parece tener dos pasos: especificación y determinación (Slack 1983). Tempranamente en el desarrollo, el destino de una célula depende de las señales ambientales, como las proporcionadas por los gradientes de proteínas mencionados antes. Esta especificación del destino celular es flexible y todavía puede alterarse en respuesta a señales de otras células. Sin embargo, finalmente las células experimentan una transición desde este tipo de com-

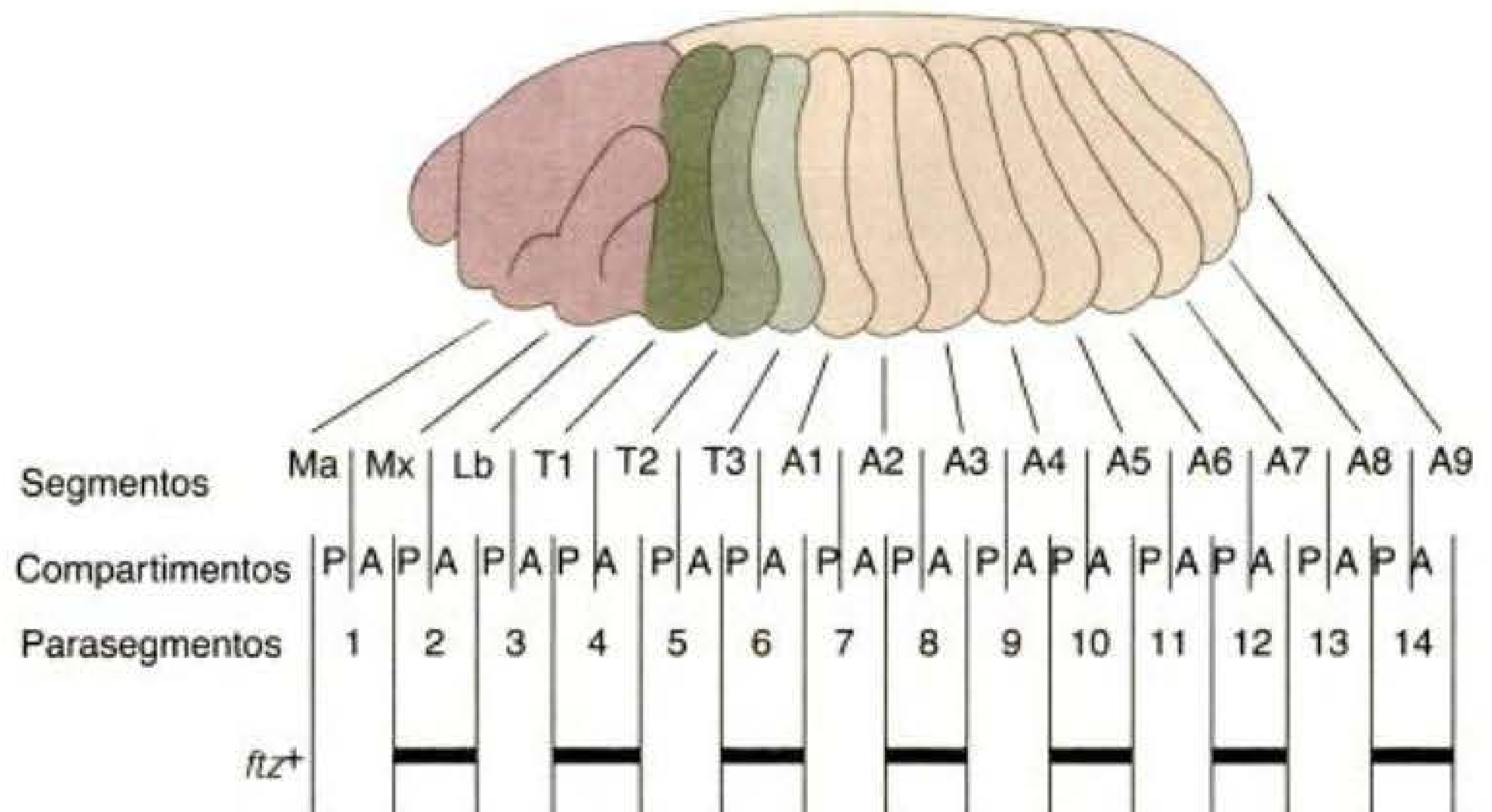


Fig. 9-19. Segmentos y parasegmentos. A y P representan los compartimentos anterior y posterior de los segmentos. Los parasegmentos están desplazados un compartimento adelante. Ma, Mx y Lb representan a tres segmentos de la cabeza (mandibular, maxilar y labial), los segmentos T son torácicos y los segmentos A son abdominales. Los parasegmentos están numerados del 1 al 14. La barra debajo del mapa muestra los límites de expresión de genes observados mediante hibridación in situ de cDNA radiactivo del gen pair-rule *fushi tarazu* (*ftz*). (Según Martínez-Arias y Lawrence 1985.)

promiso flexible a una determinación irreversible. En este punto, el destino de un célula se hace intrínseco de la célula.*

La transición desde la especificación a la determinación en *Drosophila* está mediada por los **genes de segmentación.** Estos genes dividen al embrión temprano en una serie repetida de primordios segmentarios a lo largo del eje anteroposterior. Las mutaciones en los genes de segmentación hacen que el embrión carezca de ciertos segmentos o partes de segmentos. Estas mutaciones afectan con frecuencia a los **parasegmentos**, las regiones del embrión que están separadas por engrosamientos mesodérmicos y surcos ectodérmicos. Los genes de segmentación dividen al embrión en 14 parasegmentos (Martínez-Arias y Lawrence 1985). Los parasegmentos del embrión no llegan a convertirse en los segmentos de la larva o del adulto; en su lugar, incluyen la parte posterior de un segmento anterior y la parte anterior del segmento detrás de éste (fig. 9-19). Mientras que los segmentos son las principales divisiones anatómicas del plan corporal de la larva y del adulto, éstos son construidos de acuerdo con reglas que utilizan los parasegmentos como la unidad básica de construcción.

Hay tres clases de genes de segmentación y que se expresan secuencialmente (véase fig. 9-8). La transición desde un embrión caracterizado por gradientes de morfógeno hacia un embrión con distintas unidades es llevada a cabo por los productos de los **genes gap**. Los genes gap son activados o reprimidos por los genes de efecto materno y dividen al embrión en amplias regiones, cada una con varios primordios de parasegmentos. El gen *Krüppel*, por ejemplo, es expresado primariamente en los parasegmentos 4 a 6, en el centro del embrión de *Drosophila* (figs. 9-20A y 9-8C); ante la ausencia de la proteína Krüppel el embrión carece de estas regiones.

Los productos proteicos de los genes gap interactúan con las proteínas de los genes gap vecinos para activar la transcripción de los **genes pair-rule**. Los productos de estos genes subdividen a las regiones amplias del gen gap en parasegmentos. Las mutaciones de los genes pair-rule como la de *fushi tarazu* generalmente suprimen porciones de segmentos alternados (figs. 9-21, 9-20B, 9-8C). Finalmente, los **genes de polaridad de segmento** son responsables del mantenimiento de ciertas estructuras repetidas dentro de cada segmento. Las mutaciones en los genes de polaridad de segmento hacen que una porción de cada segmento sea eliminada y reemplazada por una estructura en espejo de otra porción del segmento. Por ejemplo, en los mutantes de *engrailed*, las porciones de la parte posterior de cada segmento son reemplazadas por duplicaciones de la región anterior del segmento subsiguiente (figs. 9-20C, 9-8E). Por lo tanto, los genes de segmentación son factores de transcripción que utilizan los gradientes del embrión en segmentación temprana para transformar al embrión en una estructura periódica y parasegmentaria.

Después de que los límites parasegmentarios son establecidos, los genes pair-rule y gap interactúan para regular a los genes selectores homeóticos, que determinan la identidad de cada segmento. Hacia el final del estadio de blastodermo celular, se le ha dado a cada primordio de segmento una identidad individual para su constelación única de los productos de los genes gap, pair-rule y homeóticos (Levine y Harding 1989).

Los genes gap

Los genes gap fueron descubiertos a través de una serie de embriones mutantes que carecían de grupos de segmentos consecutivos (fig. 9-22; Nüsslein-Volhard y Wieschaus 1980). Las supresiones causadas por las mutaciones de los genes *hunchback*, *Krüppel* y *knirps* abarcan la totalidad de la región segmentada del embrión de *Drosophila*. El gen gap *giant* se superpone con estos tres y las mutaciones de los genes gap *tailless* y *huckebein* eliminan porciones terminales no segmentadas del embrión.

* Los aficionados a la teoría de la información reconocerán que el proceso por el cual la información anteroposterior en los gradientes morfogenéticos es transferida a discretos y diferentes parasegmentos representa una transición desde la especificación analógica a la digital. La especificación es analógica, la determinación es digital. Este proceso le permite a la información transitoria de los gradientes en el blastodermo sincitial estabilizarse de modo tal que puede ser utilizada mucho más tarde en el desarrollo (Baumgartner y Noll 1990).

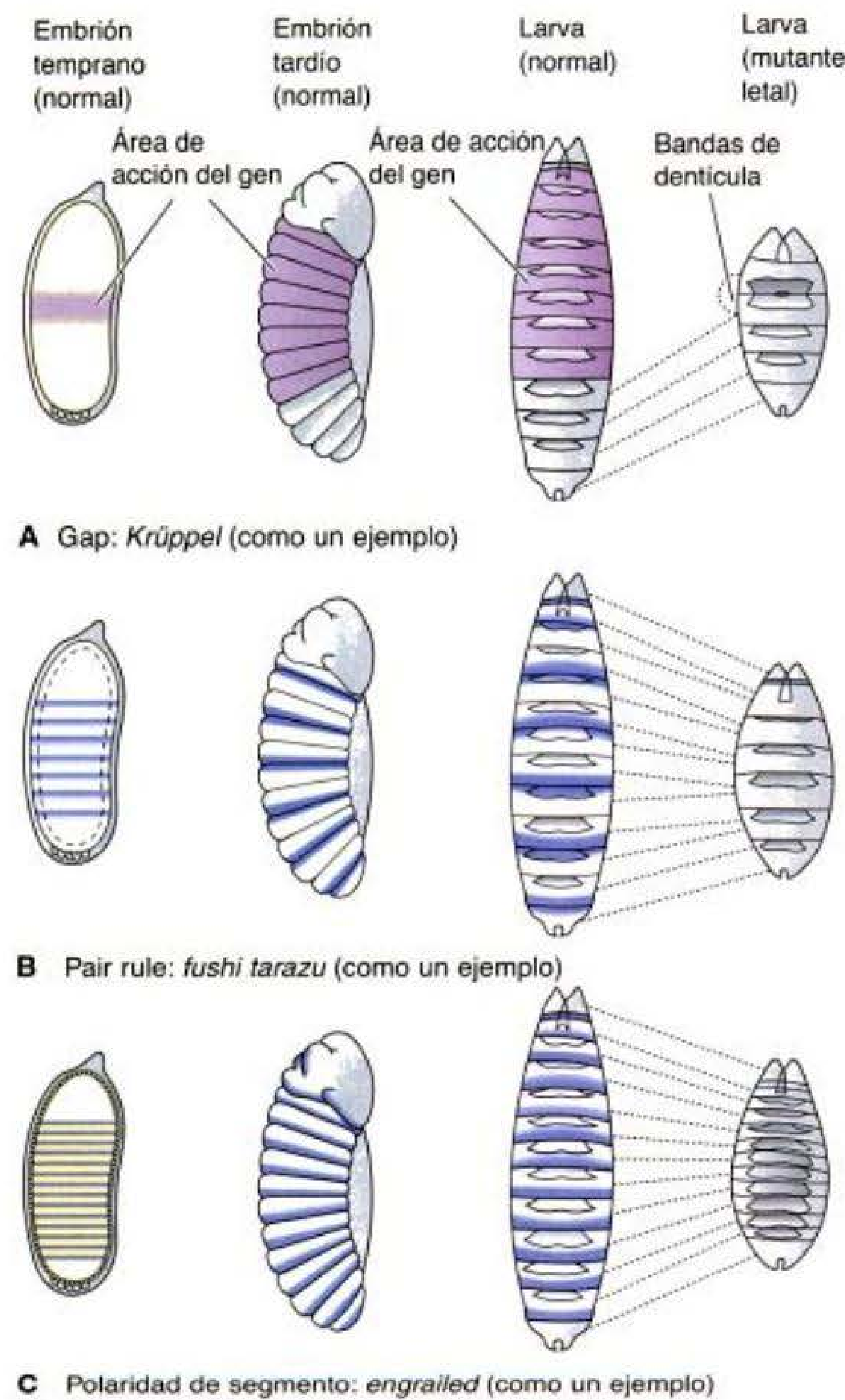


Fig. 9-20. Tres tipos de mutaciones de los genes de segmentación. El panel de la izquierda corresponde a los embriones en segmentación temprana, que muestra en color la región donde el gen particular se transcribe normalmente en los embriones tipo salvaje. Estas áreas son suprimidas cuando se desarrolla el mutante.

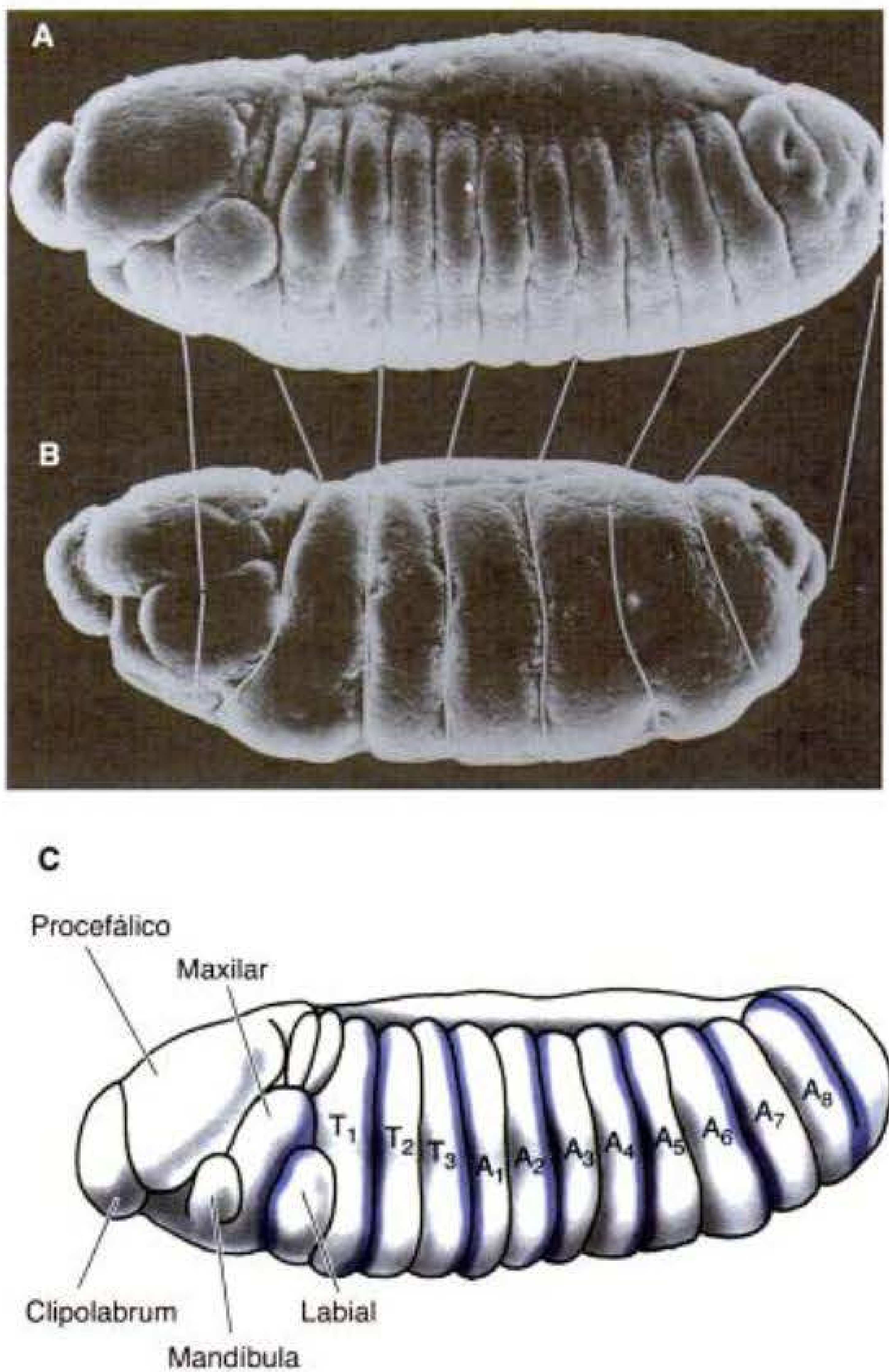


Fig. 9-21. Defectos observados en el mutante de *fushi tarazu*. **A.** Microfotografía electrónica de barrido de un embrión tipo salvaje, observada en su vista lateral. **B.** El mismo estadio de un embrión mutante de *fushi tarazu*. Las líneas blancas conectan las porciones homólogas de la banda germinal segmentada. **C.** Diagrama de la segmentación embrionaria tipo salvaje. Las áreas sombreadas muestran los parasegmentos de la banda germinal que están ausentes en el embrión mutante. (Según Kaufman y col. 1990; fotografías cortesía de T. Kaufman.)

La expresión de los genes gap es dinámica. Hay, en general, un bajo nivel de actividad de transcripción a través de la totalidad del embrión que llega a consolidarse a medida que continúa la segmentación en distintas regiones de alta actividad (Jäckle y col. 1986). El elemento crítico parece ser la expresión de la proteína Hunchback, que hacia el final del ciclo 12 de división nuclear se encuentra en altos niveles a través de la parte anterior del embrión y luego forma un gradiente pronunciado por aproximadamente 15 núcleos (véase fig. 9-12). El último tercio del embrión tiene niveles de Hunchback indetectables. Los patrones de transcripción de los genes gap anteriores son iniciados por las diferentes concentraciones de las proteínas Hunchback y Bicoid. Los altos niveles de Hunchback inducen la expresión de *giant*, mientras que el transcrito de *krüppel* aparece sobre la región donde Hunchback comienza a disminuir. Los niveles altos de Hunchback también evitan la transcripción de los genes gap posteriores (como *knirps*) en la parte anterior del embrión (Struhl y col. 1992). Se piensa que un gradiente de la proteína Caudal, más alto en el polo posterior, es responsable de la activación de los genes gap abdominales *knirps* y *giant* en la parte posterior del embrión. El gen *giant* por lo tanto tiene dos métodos para su activación, uno para su banda de expresión anterior y uno para su banda de expresión posterior (Rivera-Pomar 1995; Schultz y Tautz 1995).

Después de que estos patrones han sido establecidos por los genes de efecto materno y Hunchback, la expresión de cada gen gap es estabilizada y mantenida por interacciones entre los diferentes productos de los genes gap (fig. 9-22B).* Por ejemplo, la expresión del gen

* Las interacciones entre los genes y los productos génicos son facilitadas por el hecho de que estas reacciones se producen dentro de un sincitio, en el que las membranas celulares todavía no han sido formadas.

krüppel está regulada negativamente sobre su límite anterior por Hunchback y Giant y sobre su límite posterior por Knirps y Tailless (Jäckle y col. 1986; Harding y Levine 1988; Hoch y col. 1992). Si la actividad de Hunchback está ausente, el dominio de expresión de *krüppel* se extiende hacia anterior. Si la actividad de Knirps está ausente, la expresión del gen *krüppel* se extiende hacia posterior.

Los límites entre las regiones de transcripción de los genes gap son probablemente creados mediante represión mutua. Así como las proteínas Giant y Hunchback pueden controlar el límite anterior de la transcripción de *krüppel*, de este modo la proteína Krüppel puede determinar los límites posteriores de transcripción de *giant* y *hunchback*. Si un embrión carece del gen *krüppel*, continúa la transcripción de *hunchback* en un área generalmente asignada a Krüppel (Jäckle y col. 1986; Kraut y Levine 1991). Estas inhibiciones formadoras de límites se piensa que están mediadas directamente por los productos de los genes gap debido a que los cuatro genes gap principales (*hunchback*, *giant*, *krüppel* y *knirps*) codifican proteínas de unión al DNA que pueden activar o reprimir la transcripción de otros genes gap (Knipple y col. 1985; Gaul y Jäckle 1990; Capovilla y col. 1992).

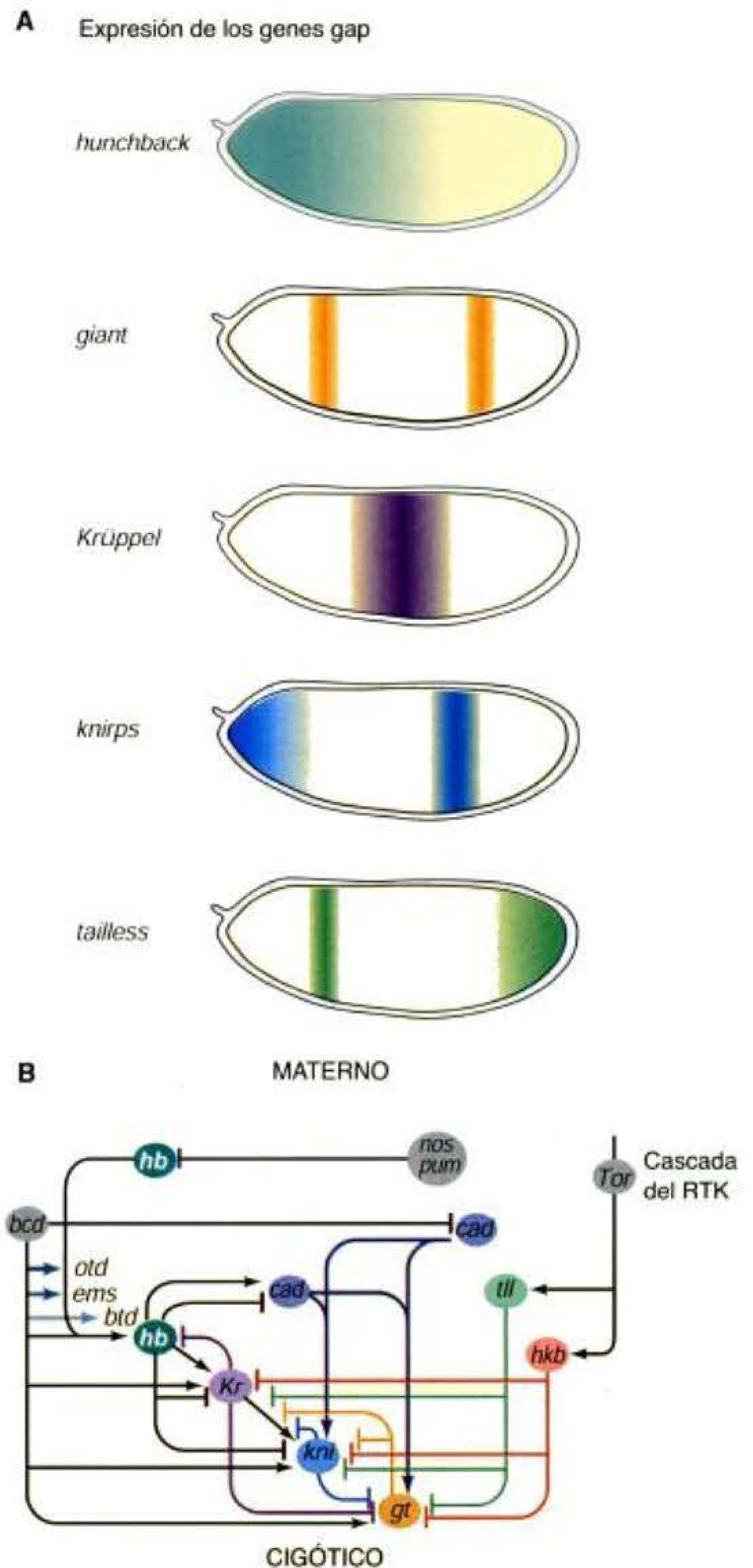


Fig. 9-22. Conversión de los gradientes de proteína materna en la expresión de los genes gap del cigoto. **A.** Patrones de expresión del gen Gap. **B.** Los gradientes de los factores de transcripción maternos de Bicoid, Caudal y Hunchback regulan la transcripción de los genes gap. Las proteínas Hunchback y Caudal provienen de *mensajeros* maternos y de nueva transcripción cigótica. Estos genes gap codifican proteínas que se difunden y las interacciones entre ellas son críticas en la activación de la transcripción de los genes pair-rule. En las dos terminales del embrión, las interacciones entre Torso y Parecida a torso activan a los genes gap *tailless* y *huckebein*. (**B**, según Rivera-Pomar y Jäckle 1996.)

Los genes pair-rule

La primera indicación de la segmentación en los embriones de mosca se produce cuando los genes pair-rule (regla de los pares) son expresados durante el ciclo 13 de división celular. Los patrones de transcripción de estos genes se basan en que ellos dividen al embrión en áreas que son precursoras del plan segmentario del cuerpo. Como se puede ver en las figuras 9-23B-E y 9-8D, una banda vertical de núcleos (las células justo están comenzando a formarse) expresan un gen pair-rule, la siguiente banda de núcleos no lo expresa y a continuación la siguiente banda lo expresa nuevamente. El resultado es un patrón de "bandas de cebra" a lo largo del eje anteroposterior, que divide al embrión en 15 subunidades (Hafen y col. 1984). Actualmente se conocen ocho genes capaces de dividir al embrión temprano de este modo; ellos son enumerados en el cuadro 9-2. Es importante observar que no todos los núcleos expresan los mismos genes de pair-rule. En efecto, dentro de cada parasegmento, cada hilera de núcleos tiene su propia constelación de expresión génica pair-rule que la distingue de cualquier otra hilera.

¿Cómo se les dice a algunos nucleos del embrión de *Drosophila* que transcriban un gen en particular mientras que se les dice a sus vecinos que no lo transcriban? La respuesta parece venir de la distribución de los productos proteicos de los genes gap. Mientras que el mRNA de cada uno de los genes gap tiene una distribución muy diferenciada que define regiones de expresión contiguas o que se superponen ligeramente, los productos proteicos de estos genes se extienden más ampliamente. En realidad, se superponen por al menos 8 a 10 núcleos (que en este estadio representan a dos o tres primordios de segmentos). Esto fue demostrado de una forma asombrosa por Štanojevíc y col. (1989), quienes fijaron blastodermos en celularización (es decir, el estadio cuando las células están comenzando a formarse en el aro del embrión sincitial), tiñeron la proteína Hunchback con un anticuerpo que lleva un tinte rojo y simultáneamente tiñeron la proteína Krüppel con un anticuerpo que lleva un tinte verde. La región en celularización que contenía a ambas proteínas unía los dos anticuerpos y era teñida de amarillo brillante (véase fig. 9-8C). Krüppel se superpone con

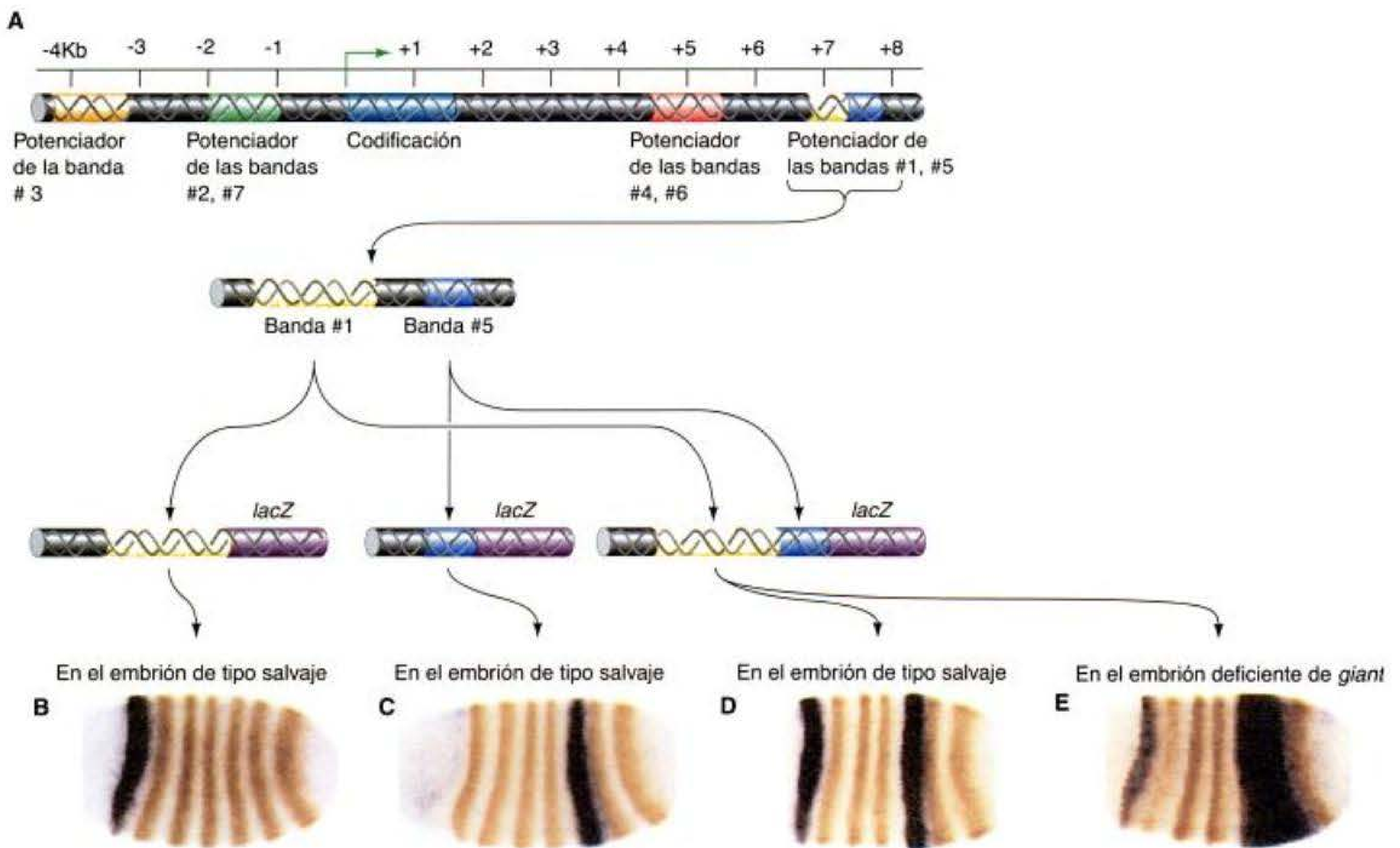


Fig. 9-23. Regiones promotoras específicas del gen *even-skipped* (*eve*) controlan a bandas de transcripción específicas en el embrión. **A.** Mapa parcial del promotor de *eve*, que muestra las regiones responsables para varias bandas. **B-E.** Un gen reportero β-galactosidasa fue fusionado en diferentes regiones del promotor de *eve* e inyectado en los ovocitos de la mosca. Los embriones obtenidos fueron teñidos (bandas naranjas) para la presencia de la proteína Even-skipped. **B-D** son embriones tipo salvaje que fueron inyectados con los transgenes *lacZ* que contienen la región potenciadora específica para la banda 1 (**B**), la banda 5 (**C**) o ambas regiones (**D**). En **E**, la región potenciadora para las bandas 1 y 5 fue inyectada en un embrión deficiente de *giant*. Aquí el borde posterior de la banda 5 está ausente. (Según Fujioka y col. 1999 y Sackerson y col. 1999; fotografías cortesía de M. Fujioka y J. B. Jaynes.)

la proteína Knirps en un modo similar en la región posterior del embrión (Pankratz y col. 1990).

Los tres genes se conocen como los genes pair-rule primarios. Estos genes –*hairy*, *even-skipped* y *runt*– son esenciales para la formación del patrón periódico y están controlados directamente por las proteínas del gen gap. Los potenciadores de los genes pair-rule primarios son reconocidos por las proteínas del gen gap y se piensa que las diferentes concentraciones de las proteínas del gen gap determinan si el gen pair-rule es transcrito o no lo es. Los potenciadores de los genes pair-rule primarios son a menudo modulares: el control de expresión de cada banda es localizado en una región distinta del DNA.

Uno de los potenciadores mejor estudiados es aquel para el gen *even-skipped*; su estructura se muestra en la figura 9-23A. Éste está compuesto de unidades modulares organizadas de modo tal que cada unidad regula a una banda por separado. Por ejemplo, la segunda banda *even-skipped* está representada por las proteínas Giant y Krüppel y es activada por Hunchback y bajas concentraciones de Bicoid (fig. 9-24; Small y col. 1991, 1992; Štanojevíc y col. 1991). La búsqueda de rastros mediante DNasa I (véase cap. 5) demostró que la región potenciadora para esta banda contiene seis sitios de unión para la proteína Krüppel, tres para la proteína Hunchback, tres para la proteína Giant y cinco para la proteína Bicoid. Del mismo modo, la banda 5 de *even-skipped* es regulada negativamente por la proteína Krüppel (sobre su borde anterior) y por la proteína Giant (sobre su borde posterior) (Small y col. 1996; Fujioka 1999).

La importancia de estos elementos potenciadores puede demostrarse por medios genéticos y bioquímicos. En primer lugar, una mutación en un potenciador en particular puede suprimir su banda particular y no otra. En segundo lugar, si un gen reportero como *lacZ* (codificando β-galactosidasa) es fusionado a uno de los potenciadores, el gen *lacZ* es expresado sólo en esa banda en particular (véase fig. 9-23; Fujioka y col. 1999). En tercer lugar, la ubicación de estas bandas puede alterarse por la eliminación de los genes gap que las regulan. Por lo tanto, la ubicación de las bandas de expresión del gen pair-rule es el resultado de: 1) los elementos potenciadores modulares regulatorios *cis* de los genes pair-rule, y 2) las proteínas gap regulatorias *trans* que se unen a estos sitios potenciadores.

Una vez iniciado por las proteínas de los genes gap, el patrón de transcripción de los genes pair-rule primarios llega a estabilizarse por la interacción entre sus productos (Levine y Harding 1989). Los genes pair-rule primarios también forman el contexto que permite o inhibe la

Cuadro 9-2 *Principales genes que afectan el patrón de segmentación en* Drosophila

Categoría	*Nombre del gen*
Genes gap	*Krüppel (Kr)* *knirps (Kni)* *hunchback (hb)* *giant (gt)* *tailless (tll)* *huckebein (hkb)* *buttonhead (btd)* *empty spiracles (ems)* *orthodenticle (otd)*
Genes pair-rule primarios	*hairy (h)* *even-skipped (eve)* *runt (run)*
Genes pair-rule secundarios	*fushi tarazu (ftz)* *odd-paired (opa)* *odd-skipped (odd)* *sloppy-paired (slp)* *paired (prd)*
Genes de polaridad de segmento	*engrailed (en)* *wingless (wg)* *cubitus interruptusD (ciD)* *hedgehog (hh)* *fused (fu)* *armadillo (arm)* *patched (ptc)* *gooseberry (gsb)* *pangolin (pan)*

expresión de los genes pair-rule secundarios que actúan más tarde. Uno de tales genes *pair-rule* secundario es *fushi tarazu* (*ftz*; japonés; "demasiados pocos segmentos"; véanse figs. 9-8, 9-20 y 9-21). Temprano, durante el ciclo 14 de división, el mRNA de *ftz* y la proteína son vistos a lo largo de la porción segmentada del embrión. Sin embargo, cuando las proteínas de los genes pair-rule primarios comienzan a interactuar con el potenciador de *ftz*, el gen *ftz* es reprimido en ciertas bandas de núcleos para crear regiones interbandas. Mientras tanto, la proteína Ftz interactúa con su propio promotor para estimular más transcripción de *ftz* donde está ya presente (fig. 9-25; Edgar y col. 1986b; Karr y Kornberg 1989; Schier y Gehring 1992).

La expresión de cada gen pair-rule en siete bandas divide al embrión en 14 parasegmentos, con cada gen pair-rule siendo expresado en parasegmentos alternados. Además, cada hilera de núcleos dentro de cada parasegmento expresa una combinación única y particular de los productos de pair-rule. Estos productos activarán el siguiente nivel de genes de segmentación, los genes de polaridad de segmento.

Los genes de polaridad de segmento

Hasta ahora, esta discusión ha descrito interacciones entre moléculas dentro del embrión sincitial. Pero una vez que se forman las células, las interacciones tienen lugar entre ellas. Estas interacciones intercelulares están mediadas por los genes de polaridad de segmento y llevan a cabo dos importantes tareas. En primer lugar, refuerzan la periodicidad parasegmentaria establecida por los factores de transcipción tempranos. En segundo lugar, a través de esta señalización célula-célula, se establecen los destinos celulares dentro de cada parasegmento.

Los genes de polaridad de segmento codifican proteínas que son constituyentes de las vías de transducción de la señal de Wingless y Hedgehog (véase cap. 6). Las mutaciones en estos genes llevan a defectos en la segmentación y en el patrón de expresión del gen en cada parasegmento. El desarrollo del patrón normal depende del hecho que solo a una hilera de células en cada parasegmento se le permite expresar la proteína Hedgehog y solo a una hilera en cada parasegmento se le permite expresar la proteína Wingless. La clave de este patrón es la activación del gen *engrailed* en las células que van a expresar la proteína Hedgehog. El gen *engrailed* es activa-

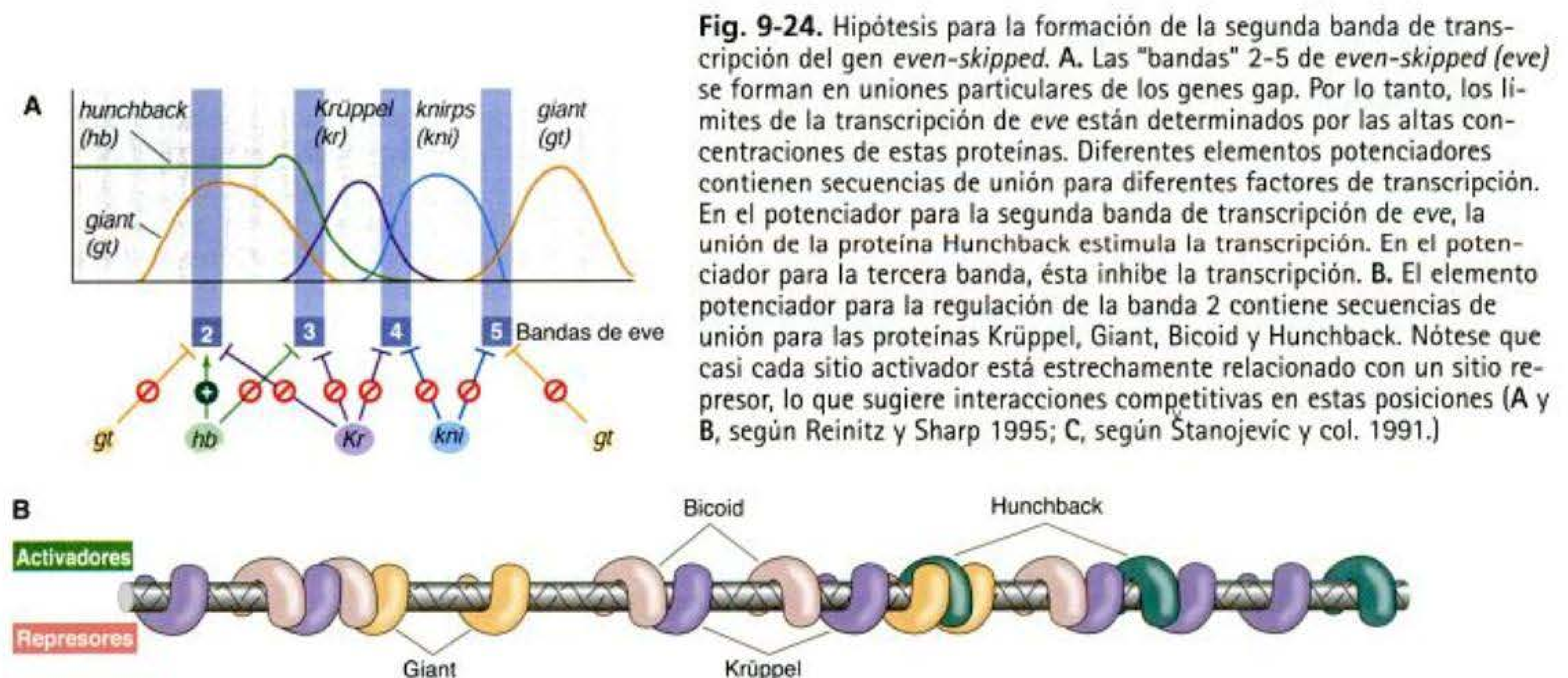


Fig. 9-24. Hipótesis para la formación de la segunda banda de transcripción del gen *even-skipped*. **A.** Las "bandas" 2-5 de *even-skipped (eve)* se forman en uniones particulares de los genes gap. Por lo tanto, los límites de la transcripción de *eve* están determinados por las altas concentraciones de estas proteínas. Diferentes elementos potenciadores contienen secuencias de unión para diferentes factores de transcripción. En el potenciador para la segunda banda de transcripción de *eve*, la unión de la proteína Hunchback estimula la transcripción. En el potenciador para la tercera banda, ésta inhibe la transcripción. **B.** El elemento potenciador para la regulación de la banda 2 contiene secuencias de unión para las proteínas Krüppel, Giant, Bicoid y Hunchback. Nótese que casi cada sitio activador está estrechamente relacionado con un sitio represor, lo que sugiere interacciones competitivas en estas posiciones (**A** y **B**, según Reinitz y Sharp 1995; **C**, según Štanojevic y col. 1991.)

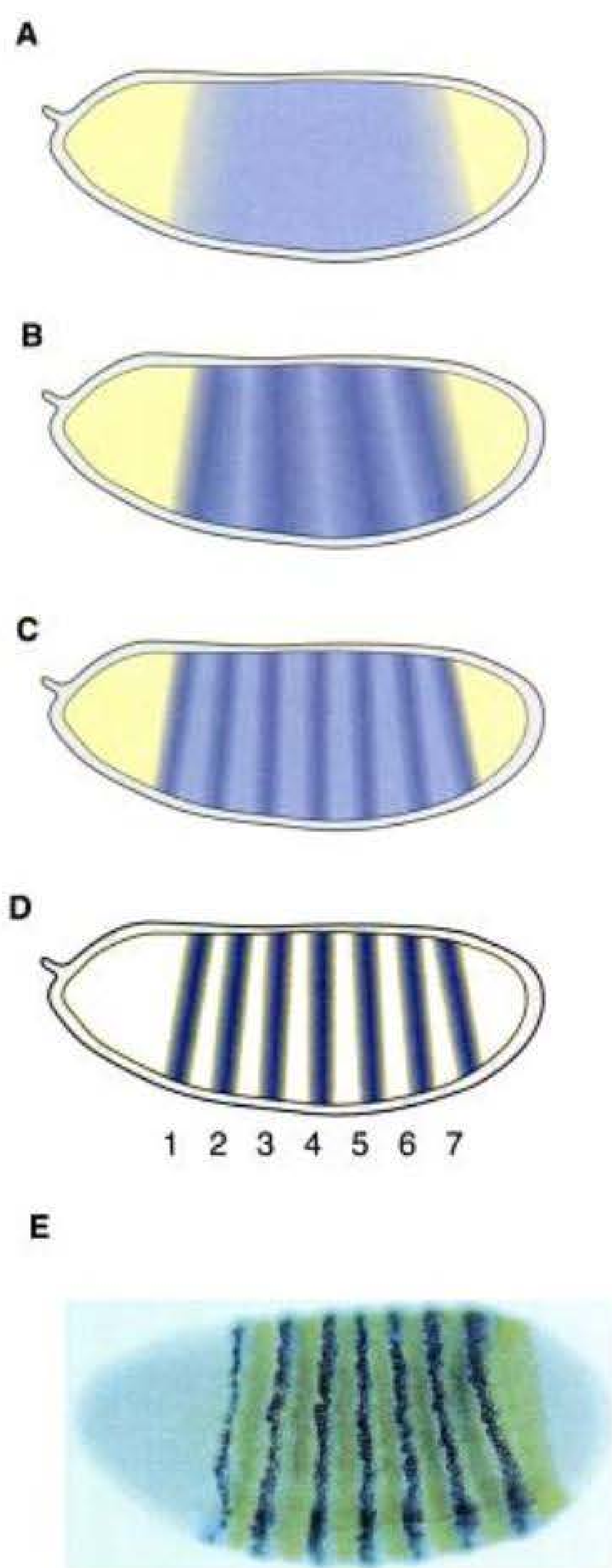


Fig. 9-25. Transcripción del gen *fushi tarazu* en el embrión de *Drosophila*. **A-D.** En el comienzo del ciclo 14 de división, hay un bajo nivel de transcripción de *ftz* en cada uno de los núcleos en la región segmentada del embrión. Dentro de los siguientes 30 minutos, el patrón de expresión se altera cuando la transcripción de *ftz* es potenciada en ciertas regiones (que forman bandas) y reprimida en las regiones interbandas. **E.** Doble marcación de los transcritos *even-skipped* (bandas azules) y *fushi tarazu* (bandas marrones), que muestran que *ftz* es expresado entre las bandas de *eve* en este estadio. (A-D, según Karr y Kornberg 1989; E, cortesía de J. B. Jaynes y M. Fujioka.)

do en las células que tienen altos niveles de los factores de transcripción Even-skipped, Fushi-tarazu o Paired. Además, éste es reprimido en las células que reciben altos niveles de las proteínas Odd-skipped, Runt o Sloppy-paired. Como resultado, Engrailed es expresado en 14 bandas a lo largo del eje anteroposterior del embrión (véase fig. 9-8E). (En efecto, en las mutaciones que hacen que el embrión sea deficiente en Fushi tarazu, solo son expresadas siete bandas de Engrailed.)

Estas bandas de transcripción de *engrailed* marcan el límite anterior de cada parasegmento (y el borde posterior de cada segmento). El gen *wingless* es activado en las bandas de células que reciben poca o ninguna proteína de Even-skipped o de Fushi tarazu, pero que contienen a Sloppy-paired. Este patrón hace que *wingless* sea transcrito solamente en las hileras de células directamente anteriores a las células donde *engrailed* es transcrito (fig. 9-26A).

Una vez que es establecida la expresión de *wingless* e *engrailed* en las células adyacentes, este patrón debe mantenerse para conservar la periodicidad parasegmentaria del plan corporal establecida por los genes pair-rule. Se debe recordar que el mRNA y las proteínas involucradas en iniciar estos patrones son de vida corta y que los patrones deben mantenerse después de que sus iniciadores no son sintetizados durante mucho tiempo. El mantenimiento de estos patrones está regulado por interacciones recíprocas entre células vecinas: las células que secretan Hedgehog activan la expresión de *Wingless* en sus vecinas; la proteína wingless es recibida por la célula que secretó Hedgehog y mantiene la expresión de *hedgehog*.

En las células que transcriben al gen *wingless*, el mRNA de *wingless* es translocado por su 3' UTR hacia el ápice de la célula (véase fig. 6-25B-D; Simmonds y col. 2001; Wilkie y Davis 2001). Como el mensajero de *bicoid* en el huevo (ovocito), el mRNA de *wingless* parece ser transportado a lo largo de los microtúbulos por las proteínas dineína. En el ápice, el mensajero de *wingless* es traducido y su producto es secretado de la célula. Las células que expresan *engrailed* pueden unir esta proteína debido a que contienen la proteína receptora de membrana de *Drosophila* para *Wingless*, D-Frizzled-2 (véase fig. 6-23C; Bhanot y col. 1996). Este receptor activa la vía de transducción de la señal de Wnt, que resulta en la expresión continua de *engrailed* (Siegfried y col. 1994).

Además, esta activación es el punto de partida para otra parte de esta vía recíproca. La proteína Engrailed activa la transcripción del gen *hedgehog* en las células que expresan *engrailed*. La proteína Hedgehog puede unirse al receptor de Hedgehog (la proteína Patched) sobre sus células vecinas. Cuando ésta se une a las células posteriores adyacentes, estimula la expresión del gen *wingless*. El resultado es un asa de estimulación recíproca por el cual las células que sintetizan Engrailed secretan la proteína Hedgehog, que mantiene la expresión del gen *wingless* en las células vecinas, mientras que a su vez las células que secretan Wingless mantienen la expresión de los genes *engrailed* y *hedgehog* en sus vecinas (Heemskerk y col. 1991; Ingham y col. 1991; Mohler y Vani 1992). En este sentido, el patrón de transcripción de estos dos tipos celulares es estabilizado. Esta interacción crea un límite estable, así como un centro señalizador a partir del cual las proteínas Hedgehog y Wingless se difunden a través del parasegmento.

Se piensa que la difusión de estas proteínas proporciona los gradientes por los cuales las células del parasegmento adquieren sus identidades. Este proceso puede verse en la epidermis dorsal, donde las hileras de las células de la larva producen diferentes estructuras cuticulares dependiendo de su posición dentro del segmento. La primera hilera de células consiste en puntas grandes y pigmentadas denominadas dentículas. En situación posterior a estas células, la segunda hilera produce una cutícula epidérmica lisa. Las dos hileras siguientes de células tienen un tercer destino, producen pelos pequeños y gruesos y éstos son seguidos por varias hileras de células que adoptan el cuarto destino, que producen pelos delgados (fig. 9-27).

Segmento | Segmento | Segmento | Segmento

Parasegmento | Parasegmento | Parasegmento | Parasegmento

A Inicio por los productos de los genes pair-rule

Concentración de los productos génicos

Eve Ftz Eve Ftz

Anterior Posterior

Células: en wg en wg en wg en wg

B Interacciones entre *engrailed* y *wingless*

Un segmento

Anterior Posterior

Competente a *engrailed* Competente a *wingless* Competente a *engrailed*

Difusión de la proteína Wingless

Expresión de *wingless* Expresión de *engrailed*

Receptores Patched

Difusión de la proteína Hedgehog

Proteína Wingless

Frizzled

Dsh

Zw3

Armadillo

Transcripción de *wingless*

Cubitus interruptus

Receptores Patched

Transcripción de *engrailed, hedgehog*

Proteína Smoothened

Hedgehog

C

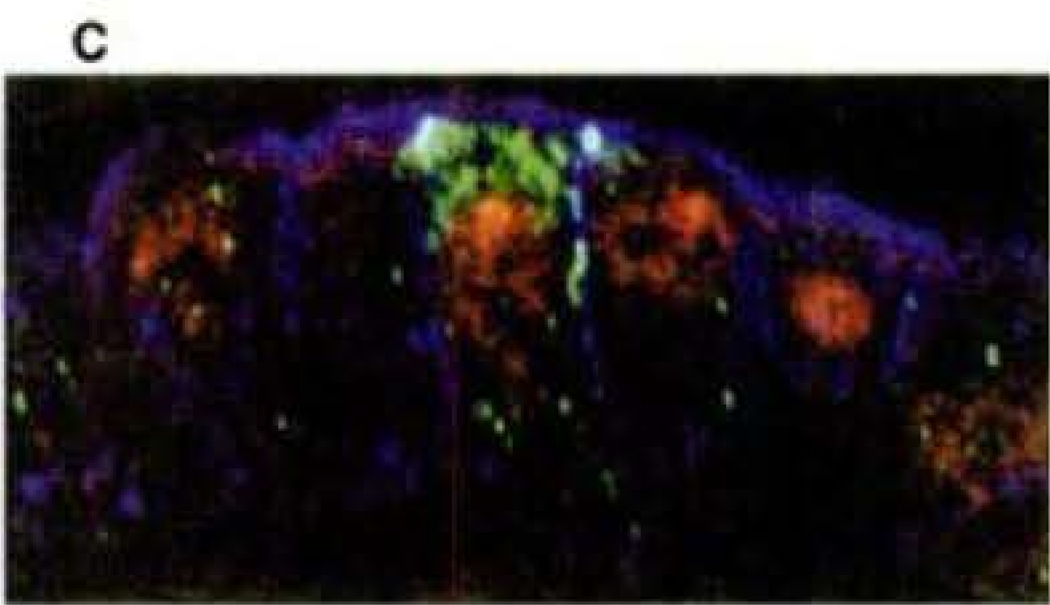


Fig. 9-26. Modelo para la transcripción de los genes de polaridad de segmento *engrailed* (*en*) y *wingless* (*wg*). **A.** La expresión de *wg* y *en* es iniciada por los genes pair-rule. El gen *en* es expresado en las células que contienen altas concentraciones de las proteínas Even-skipped o Fushi tarazu. El gen *wg* es transcrito cuando ninguno de los genes de *eve* o de *ftz* están activos, pero es expresado un tercer gen (probablemente *sloppy-paired*). **B.** La expresión continúa de *wg* y *en* es mantenida mediante interacciones entre las células que expresan Engrailed y Wingless. La proteína Wingless es secretada y se difunde hacia las células de alrededor. En las células competentes para expresar Engrailed (es decir, las que tienen las proteínas Eve o Ftz), la proteína Wingless es unida por el receptor D-Frizzled-2, que permite la activación del gen *en* mediante la vía de transducción de la señal de Wnt. (Armadillo es el nombre de *Drosophila* para la β-catenina.) La proteína Engrailed activa la transcripción del gen *hedgehog* y además activa su propia transcripción génica (*en*). La proteína Hedgehog se difunde desde estas células y se une sobre sus células vecinas a la proteína receptora Patched. Esta unión evita que la proteína Patched inhiba la señal de la proteína Smoothened. La señal de Smoothened permite la transcripción del gen *wg* y la posterior secreción de la proteína Wingless. **C.** Localización del transcrito de *wingless* en el blastodermo celular de *Drosophila*. Las membranas celulares han sido teñidas de azul, los núcleos están teñidos de rojo y los transcritos de *wingless* están teñidos de verde. (**C**, de Simmonds y col. 2001; fotografías cortesía de A. J. Simmonds.)

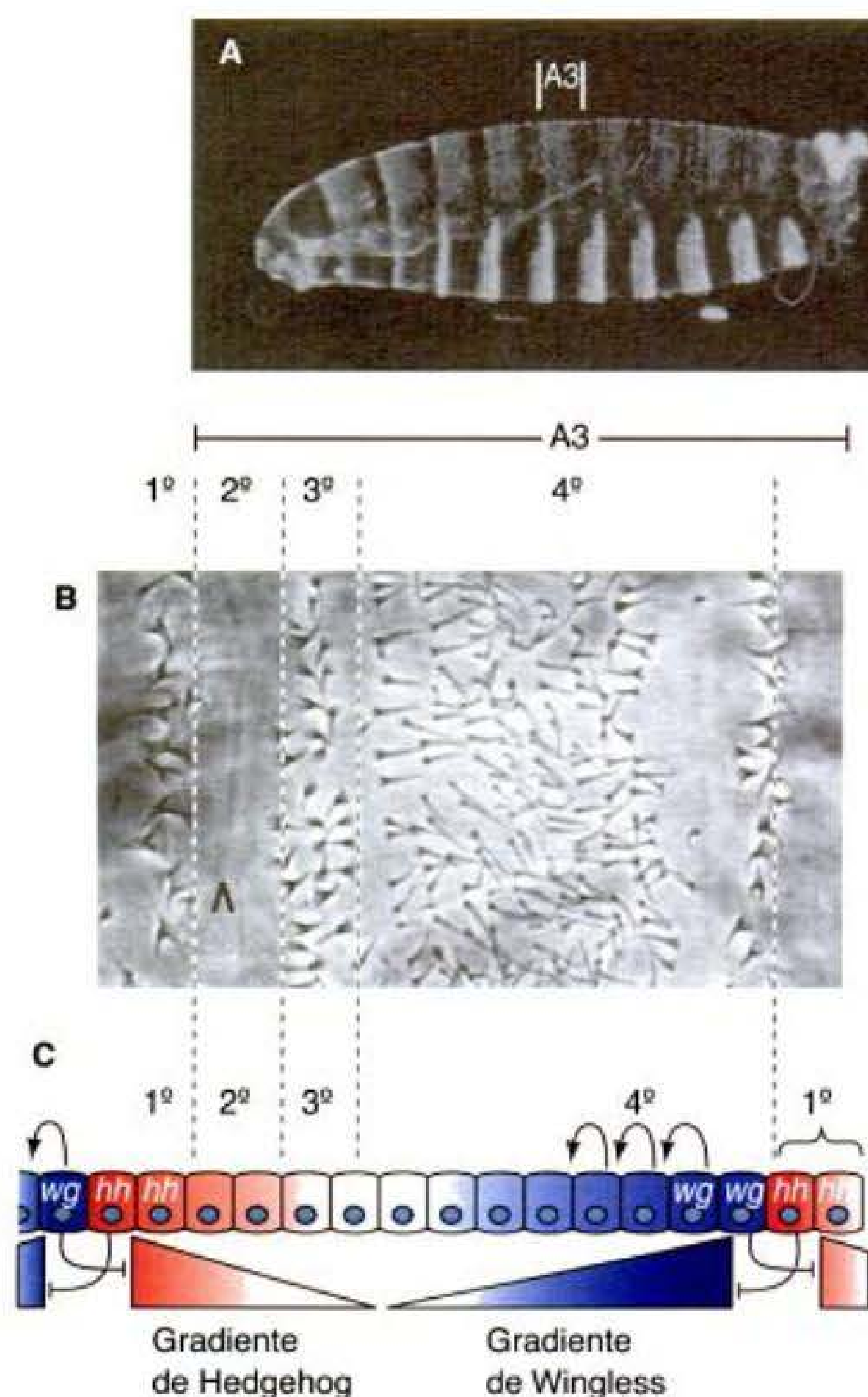


Fig. 9-27. Especificación celular por el centro de señalización Wingless/Hedgehog. **A.** Microfotografía de campo claro de un embrión de *Drosophila* tipo salvaje, que muestra la posición del tercer segmento abdominal. **B.** Primer plano del área dorsal del segmento A3, que muestra las diferentes estructuras cuticulares producidas por las hileras de células 1°, 2°, 3° y 4°. El diagrama inferior muestra un modelo para el papel de Wingless y Hedgehog. Cada señal es responsable de cerca de la mitad del patrón. Cualquiera de las dos señales actúa de un modo graduado (mostrado aquí como gradientes decrecientes con la distancia desde sus respectivas fuentes) para especificar los destinos de las células a una distancia desde las fuentes, o cada señal actúa localmente sobre las células vecinas para iniciar una cascada de inducciones (mostrado aquí como flechas secuenciales). (Según Heemskerk y DiNardo 1994; fotografías cortesía de los autores.)

Las células que expresan *wingless* se localizan dentro de la región que produce los pelos delgados, mientras que las células que expresan *hedgehog* están próximas a la 1° hilera de células. Mediante el uso de genes *hedgehog* fusionados a promotores de shock térmico, los destinos de estas células pueden ser alterados mediante un incremento o disminución experimental de los niveles de las proteínas Hedgehog o Wingless (Heemskerek y DiNardo 1994; Bokor y DiNardo 1996; Porter y col. 1996). Por lo tanto, Hedgehog y Wingless parecen ser necesarios para la elaboración del patrón total de los tipos celulares a través del parasegmento. Los gradientes de las proteínas Hedgehog y Wingless son interpretados por una segunda serie de gradientes de proteínas dentro de las células. Este segundo grupo de gradientes proporciona ciertas células con los receptores para Hedgehog y a menudo con el receptor para Wingless (Lander y col. 2002; Casal y col. 2002). El patrón resultante de los destinos celulares también cambia el centro de atención del establecimiento del patrón desde el parasegmento hacia el segmento. Hay ahora marcadores externos, cuando las células que expresan *engrailed* se convierten en las células más posteriores de cada segmento.

SITIO WEB 9.7 **Propagación asimétrica de los morfógenos (Asymmetrical spread of morphogens).** Es improbable que morfógenos como Wingless se propaguen por difusión libre. La asimetría de la difusión de Wingless sugiere que las células vecinas juegan un papel decisivo en el desplazamiento de la proteína.

SITIO WEB 9.8 **Obtener una cabeza en la mosca (Getting a head in the fly).** Los genes de polaridad de segmento actúan de modo diferente en la cabeza con respecto al tronco. En efecto, la formación de la cabeza de *Drosophila* puede diferir significativamente del modo en el que es formado el resto del cuerpo.

Los genes selectores homeóticos

Patrones de expresión del gen homeótico

Luego que los límites segmentarios han sido establecidos, las estructuras características de cada segmento son especificadas. Esta especificación es llevada a cabo por los **genes selectores homeóticos** (Lewis 1978). Dos regiones del cromosoma 3 de *Drosophila* contienen la mayoría de estos genes homeóticos (fig. 9-28). Una de estas, el **complejo Antennapedia**, contiene los genes homeóticos *labial* (*lab*), *Antennapedia* (*Antp*), *sex combs reduced* (*scr*), *Deformed* (*dfd*) y *proboscipedia* (*pb*). Los genes *labial* y *Deformed* especifican los segmentos de la cabeza, mientras que *sex combs reduced* y *Antennapedia* contribuyen a darle sus identidades a los segmentos torácicos. El gen *proboscipedia* parece actuar solo en adultos, pero ante su ausencia, los palpos labiales de la boca se transforman en patas (Wakimoto y col. 1984; Kaufman y col. 1990).

La segunda región de genes homeóticos es el **complejo bithorax** (Lewis 1978). En este complejo se encuentran tres genes que codifican proteína: *Ultrabithorax* (*Ubx*), que es requerido para la identidad del tercer segmento torácico; y los genes *abdominal A* (*abdA*) y *Abdominal B* (*AbdB*), que son responsables de las identidades segmentarias de los segmentos abdominales (Sánchez-Herrero y col. 1985). El fenotipo letal del mutante de punto triple *Ubx*⁻, *abdA*⁻, *AbdB*⁻ es idéntico al que resulta de una eliminación de la totalidad del complejo bithorax (Casanova y col. 1987). La región cromosómica que contiene a los complejos Antennapedia y bithorax es referida frecuentemente como el **complejo homeótico** (**Hom-C**).

Debido a que los genes selectores homeóticos son responsables de la especificación de las partes corporales de

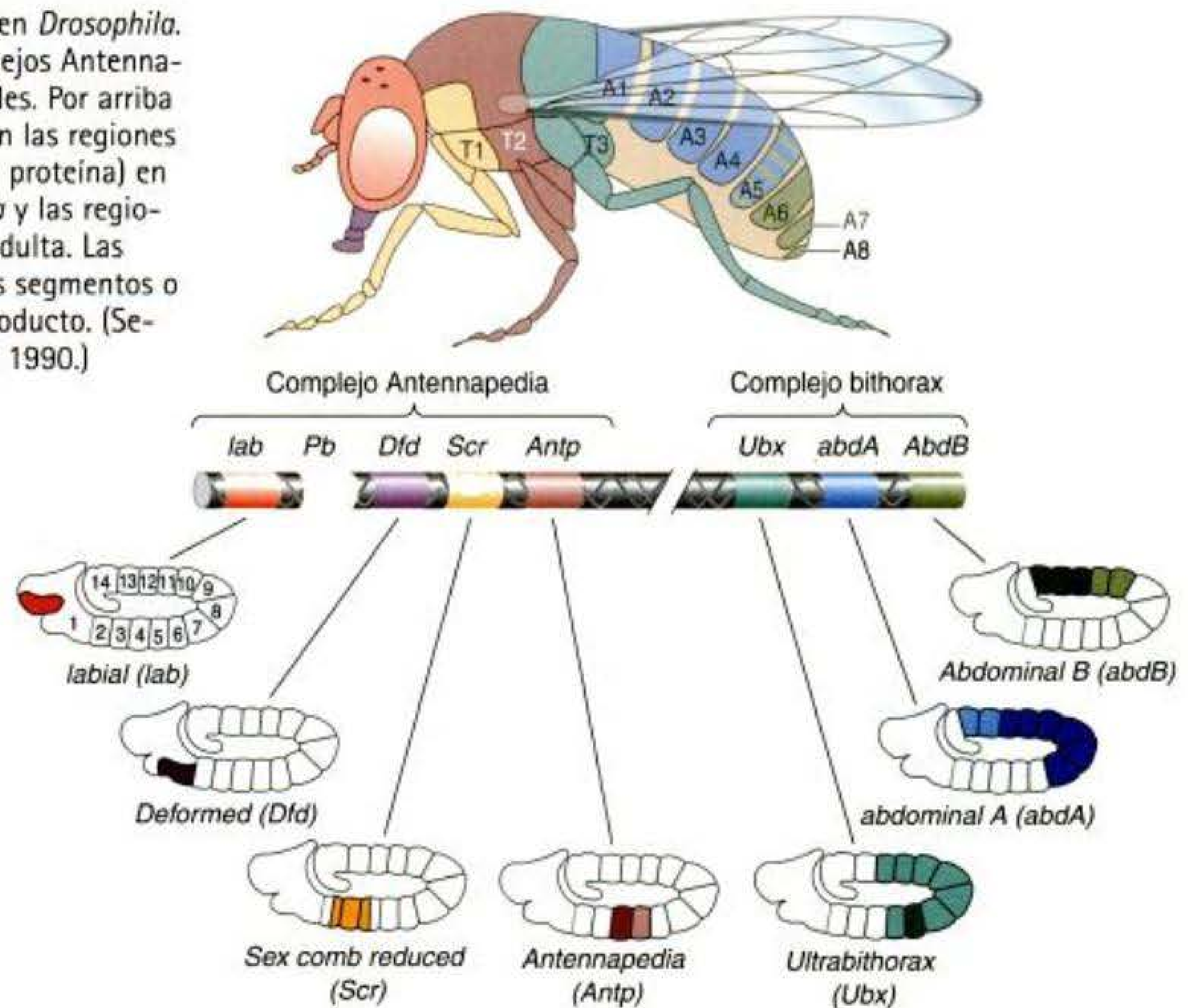


Fig. 9-28. Expresión del gen homeótico en *Drosophila*. En el centro están los genes de los complejos Antennapedia y bithorax y sus dominios funcionales. Por arriba y por debajo del mapa génico se muestran las regiones de expresión del gen homeótico (mRNA y proteína) en el blastodermo del embrión de *Drosophila* y las regiones que se forman de ellos en la mosca adulta. Las áreas sombreadas oscuras representan los segmentos o parasegmentos con la mayor parte del producto. (Según Dessain y col. 1992 y Kaufman y col. 1990.)

la mosca, sus mutaciones llevan a fenotipos estrambóticos. En 1894; William Bateson denominó a estos organismos **mutantes homeóticos** y ellos fascinaron a los biólogos del desarrollo durante décadas.* Por ejemplo, el cuerpo de la mosca adulta normal contiene tres segmentos torácicos, cada uno de los cuales produce un par de patas. El primer segmento torácico no produce otro apéndice, pero el segundo segmento torácico produce un par de alas además de sus patas. El tercer segmento torácico produce un par de balanceadores denominados **halterios**. En los mutantes homeóticos, estas identidades segmentarias específicas pueden ser cambiadas. Cuando el gen *Ultrabithorax* es eliminado, el tercer segmento torácico (caracterizado por halterios) es transformado en otro segundo segmento torácico. El resultado es una mosca con cuatro alas (fig. 9-29) –una situación embarazosa para un díptero clásico.†

Del mismo modo, la proteína Antennapedia con frecuencia especifica el segundo segmento torácico de la mosca. Pero cuando las moscas tienen una mutación en la cual el gen *Antennapedia* es expresado en la cabeza (así como en el tórax), en las fosas de la cabeza crecen patas en lugar de antenas (fig. 9-30). En el mutante recesivo de *Antennapedia*, el gen es incapaz de ser expresado en el segundo segmento torácico y sale una antena en las posiciones de la pata (Struhl 1981; Frischer y col. 1986; Schneuwly y col. 1987).

Los principales genes selectores homeóticos han sido clonados y su expresión analizada mediante hibridación in situ (Harding y col. 1985; Akam 1987). Los transcritos de cada gen pueden detectarse en regiones específicas del embrión y son especialmente prominentes en el sistema nervioso central (véase fig. 9-28).

Inicio de los patrones de expresión del gen homeótico

El dominio inicial de expresión del gen homeótico está influido por los genes gap y los genes pair-rule. Por ejemplo, la expresión de los genes *abdA* y *AbdB* es reprimida por las proteínas de los genes gap Hunchback y Krüppel. Esta inhibición evita que estos genes que especifican abdomen sean expresados en la cabeza y el tórax (Casares y Sánchez-Herrero 1995). Por el contrario, el gen *Antennapedia* es activado por niveles particulares de Hunchback (y necesita de mensajeros transcritos materno y cigótico), de modo tal que *Antennapedia* es originalmente transcrita en el parasegmento 4, y especifica el segmento mesotorácico (T2) (Wu y col. 2001). Los límites de expresión de los genes homeóticos son reducidos con rapidez a los parasegmentos definidos por las proteínas Fushi tarazu e Even-skipped (Ingham y Martínez-Arias 1986; Müller y Bienz 1992).

* Vocabulario "homeo": *Homeo* significa "similar." Los *mutantes homeóticos* son mutantes en los que una estructura es reemplazada por otra (en donde una antena es sustituida por una pata). Los *genes homeóticos* son genes cuya mutación puede causar tales transformaciones; por lo tanto, son genes que especifican la identidad de un segmento particular en el cuerpo. La *caja homeótica* (homeobox) es una secuencia conservada de DNA de cerca de 180 pares de bases que es compartida por muchos genes homeóticos. Esta secuencia codifica un homeodominio de 60 aminoácidos, que reconoce secuencias específicas de DNA. El *homeodominio* es una región importante de los factores de transcripción codificado por los genes homeóticos (véase Información adicional y especulaciones). Sin embargo, no todos los genes que contienen caja homeótica son genes homeóticos.

† Se piensa que los dípteros (insectos de dos alas como las moscas) han evolucionado desde insectos de cuatro alas; es posible que este cambio haya surgido mediante alteraciones en el complejo bithorax. El capítulo 23 incluye más información sobre la relación entre el complejo homeótico y la evolución.



Fig. 9-29. Una mosca de la fruta de cuatro alas construida al poner juntas tres mutaciones en los reguladores *cis* del gen *Ultrabithorax*. Estas mutaciones efectivamente transforman el tercer segmento torácico en otro segundo segmento torácico (es decir, halterios en alas). (Fotografía cortesía de E. B. Lewis.)

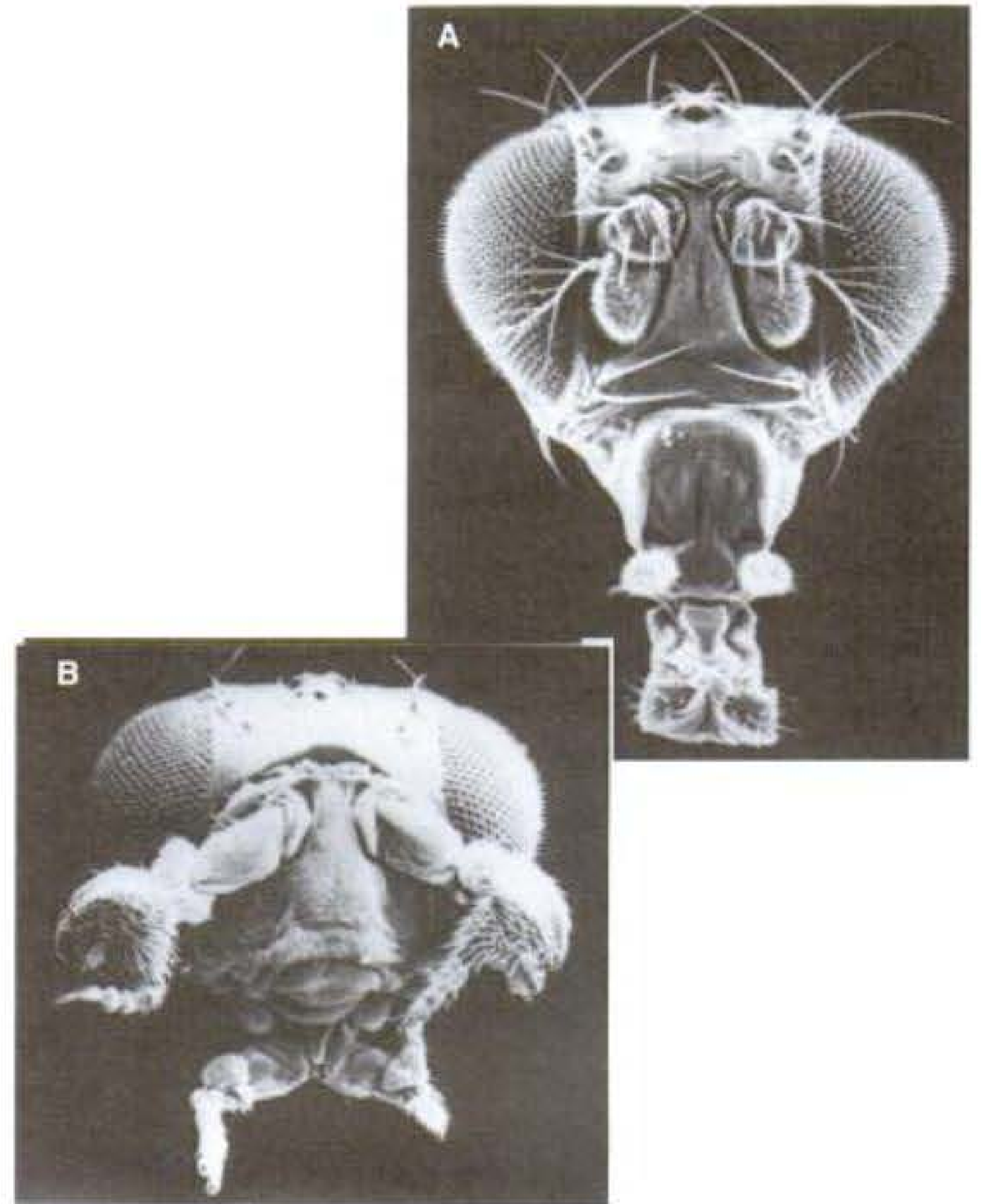


Fig. 9-30. **A.** Cabeza de una mosca de la fruta tipo salvaje. **B.** Cabeza de una mosca que contiene la mutación *Antennapedia* que convierte la antena en patas. (De Kaufman y col. 1990; fotografías cortesía de T. C. Kaufman.)

Mantenimiento de los patrones de expresión del gen homeótico

La expresión de los genes homeóticos es un proceso dinámico. El gen *Antennapedia*, por ejemplo, aunque es inicialmente expresado en el parasegmento presuntivo 4, pronto aparece en el parasegmento 5. A medida que se expande la banda germinal, la expresión de *Antp* es vista en el tubo neural presuntivo tan lejos hacia posterior como en el parasegmento 12. Durante el desarrollo posterior, el dominio de expresión de *Antp* se contrae nuevamente y el transcrito de *Antp* está localizado totalmente en los parasegmentos 4 y 5. Como en otros genes homeóticos, la expresión de *Antp* está regulada negativamente por todos los productos de genes homeóticos expresados posteriores a éste (Harding y Levine 1989; González-Reyes y Morata 1990). En otras palabras, cada uno de los genes del complejo bithorax reprime la expresión de *Antennapedia*. Si el gen *Ultrabithorax* es eliminado, la actividad de *Antp* se extiende a través de la región que normalmente debería haber expresado *Ubx* y detenerse donde comienza la región de *Abd*. (Esto permite al tercer segmento torácico formar alas como el segundo segmento torácico, como en la fig. 9-29.) Si es suprimida la totalidad del complejo bithorax, la expresión de *Antp* se extiende a través del abdomen. (Tal larva no sobrevive, pero el patrón de la cutícula a lo largo de todo el abdomen es el que corresponde al segundo segmento torácico.)

Como se ha visto, las proteínas del gen gap y del gen pair-rule son transitorias, pero sus identidades de segmentos deben estabilizarse de modo tal que pueda producirse la diferenciación. Por lo tanto, una vez que los patrones de transcripción de los genes homeóticos han llegado a estabilizarse, ellos son "bloqueados" en el lugar por la alteración de la conformación de la cromatina en estos genes. La represión de los genes homeóticos parece ser mantenida por la familia de proteínas Polycomb, mientras que la conformación activa de la cromatina parece ser mantenida por las proteínas Trithorax (Ingham y Whittle 1980; McKeon y Brocla 1991; Simon y col. 1992).

Genes realizadores

Los genes homeóticos funcionan mediante la activación o represión de un grupo de "genes realizadores" (*realisator genes*), aquellos genes que son el blanco de interés de las proteínas de los genes homeóticos y que funcionan para formar los tejidos específicos o los primordios de los órganos. Por ejemplo, *Antennapedia* es expresado en la formación del segundo segmento torácico. La proteína de Antennapedia se une y reprime a potenciadores de al menos dos genes, *homothorax* y *eyeless*, que codifican factores de transcripción que son críticos para la formación de la antena y del ojo, respectivamente* (Casares y Mann 1998; Plaza y col. 2001). Por esta razón, una de las funciones de *Antennapedia* es suprimir los genes que podrían desencadenar el desarrollo de la antena y del ojo.

La proteína Ultrabithorax es capaz de reprimir la expresión del gen *wingless* en las células que llegarán a ser

* La proteína Homothorax parece ser un cofactor para la proteína Distal-less. Mientras que las mutaciones que afectan cualquiera de estas proteínas causan transformación de antena a pata, ambas proteínas son necesarias para la expresión de genes específicos de la antena (Dong y col. 2000).

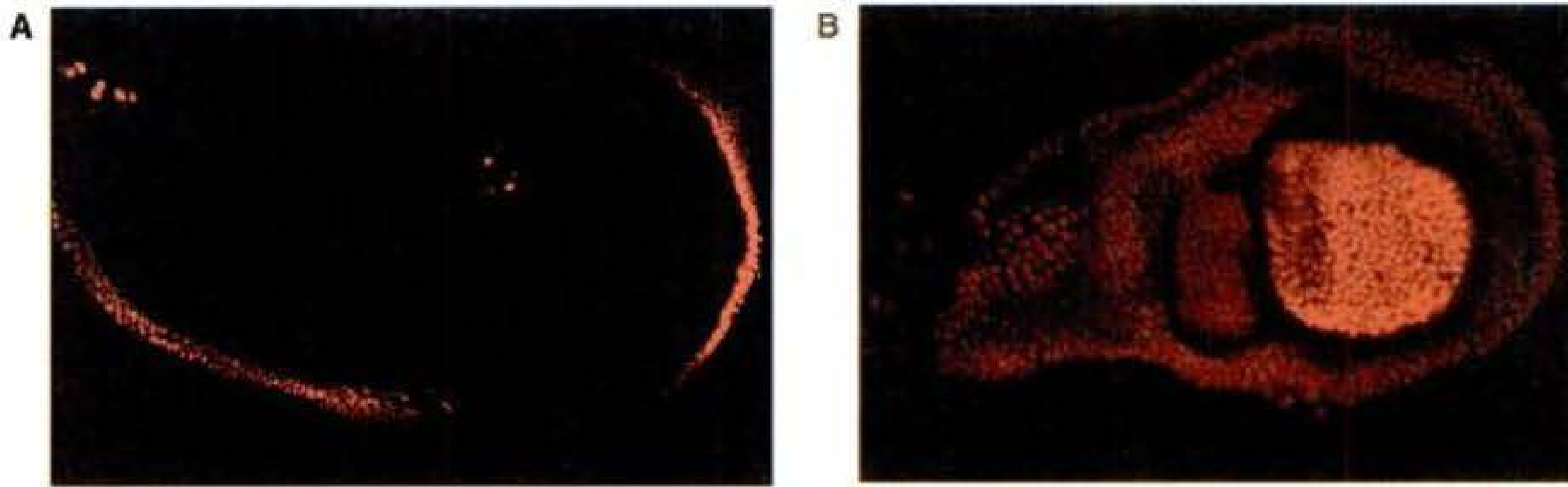


Fig. 9-31. Tinción de anticuerpo de la proteína Ultrabithorax en **A**, el disco del ala y **B**, el disco del halterio de la larva de *Drosophila* en tercer estadio. Las células de estos discos darán origen al ala y a un halterio, respectivamente. En el disco del ala, la tinción de Ultrabithorax puede verse solamente sobre las células que forman la membrana peripodial y no sobre aquellas que forman el ala. En los discos de halterio, Ultrabithorax se encuentra en las células que producirán la porción principal del halterio. (De Weatherbee y col. 1998; fotografías cortesía de S. D. Weatherbee y S. Carroll.)

los halterios de la mosca. Una de las principales diferencias entre las células del disco imaginal dorsal del segundo y del tercer segmento torácico es que la expresión de *wingless* se produce en las células del disco imaginal del segundo segmento torácico, pero no en las del tercer segmento torácico. Wingless actúa en estos tejidos como un promotor del crecimiento y como morfógeno. La proteína Ubx es hallada en las células del tercer segmento torácico, y Ubx evita la expresión del gen *wingless* (fig. 9-31; Weatherbee y col. 1998). Por lo tanto, una de las formas mediante la cual la proteína Ubx especifica al tercer segmento torácico es al impedir la expresión de aquellos genes que podrían generar tejido del ala.

Otro blanco de interés de las proteínas homeóticas, el gen *distal-less* (en sí mismo un gen que contiene un homeobox (caja homeótica): véase Información adicional y especulaciones), es necesario para el desarrollo del miembro y está activo únicamente en el tórax. La expresión de Distal-less es reprimida en el abdomen mediante una combinación de las proteínas Ubx y AbdA, que se unen a su potenciador y bloquean su transcripción (Vachon y col. 1992; Castelli-Gair y Akam 1995). Este patrón de expresión presenta una paradoja, debido a que el parasegmento 5 (enteramente torácico y productor de la pata) y el parasegmento 6 (que incluye la mayor parte del primer segmento abdominal sin pata) expresan Ubx. ¿Cómo pueden ser especificados por el mismo gen estos dos segmentos muy diferentes?

Castelli-Gair y Akam (1995) han demostrado que la sola presencia de la proteína Ubx en un grupo de células no es suficiente para la especificación. En su lugar, el tiempo y el lugar de su expresión dentro del parasegmento pueden ser críticos. Antes de la expresión de Ubx, los parasegmentos 4 a 6 tienen potenciales semejantes. En el ciclo 10 de división, la expresión de Ubx en las partes anteriores de los parasegmentos 5 y 6 evita que estos parasegmentos formen estructuras (como el espiráculo anterior) características del parasegmento 4. Además, en el compartimento posterior del parasegmento 6 (pero no en el parasegmento 5), Ubx bloquea la formación del primordio del miembro mediante la represión del gen *Distal-less*. En el ciclo 11 de división, momento en el cual Ubx ha dominado todo el parasegmento 6, el gen *Distal-less* se ha hecho autorregulador y no puede ser reprimido por Ubx (fig. 9-32).

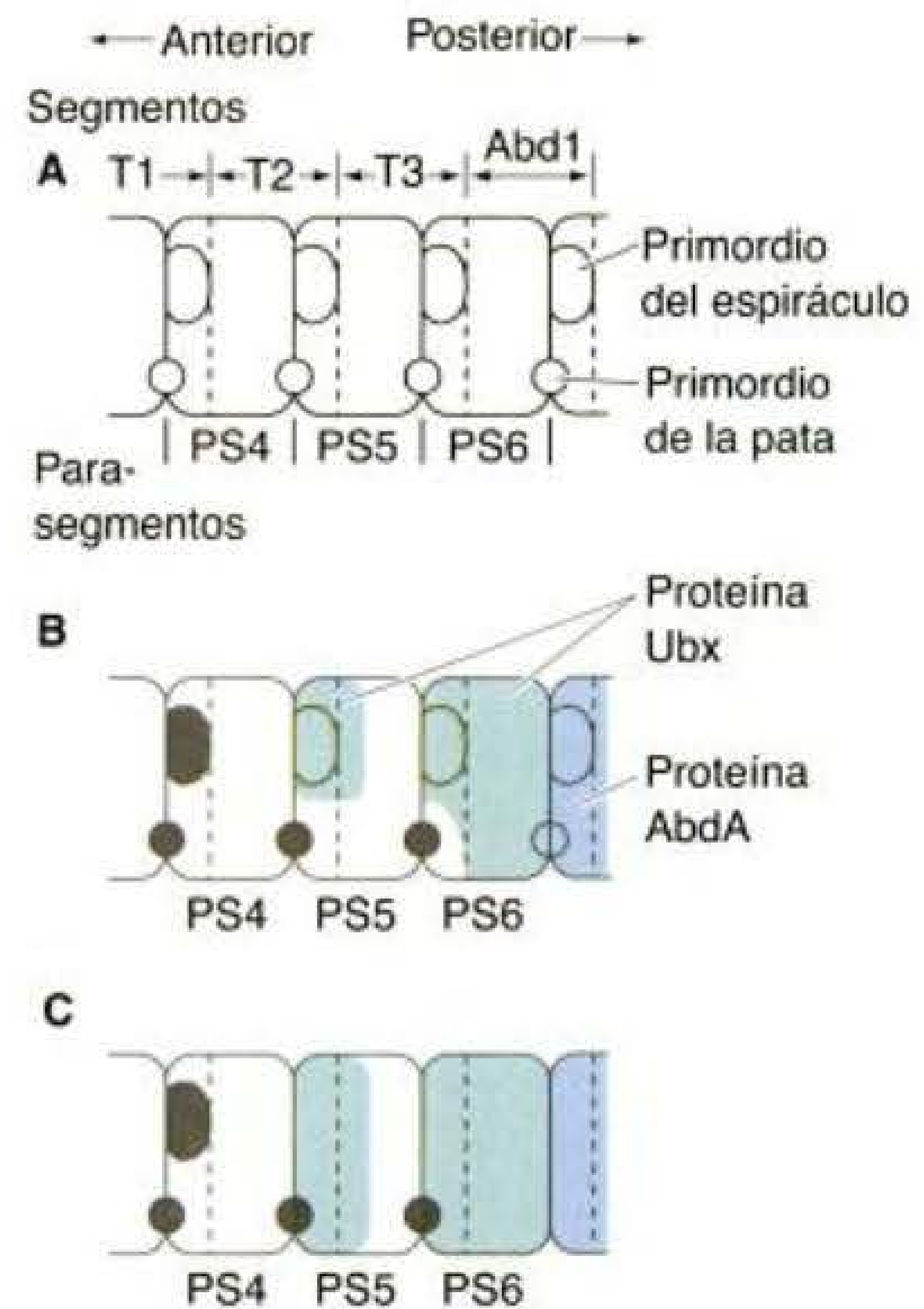


Fig. 9-32. Representación esquemática de las diferencias de expresión de *Ubx* entre los parasegmentos 5 y 6. **A.** Antes de la expresión de *Ubx*, cada parasegmento es competente para producir espiráculos y patas. **B.** En el ciclo 10 de división, la expresión temprana de *Ubx* bloquea la formación del espiráculo anterior en PS5 y PS6 y evita la formación del miembro en el compartimento posterior de PS6. La proteína AbdA juega el mismo papel en otros segmentos abdominales. **C.** En el ciclo 11 de división, el dominio de expresión de *Ubx* se extiende hacia el primordio del miembro de PS5 y PS6, pero es "demasiado tarde" para reprimir la expresión del gen *Distal-less*. (Según Castelli-Gair y Akam 1995.)

Información adicional y especulaciones

Las proteínas de homeodominio

Las proteínas de homeodominio son una familia de factores de transcripción caracterizadas por un dominio de 60 aminoácidos (el **homeodominio**) que se une a ciertas regiones del DNA. El homeodominio fue descubierto primero en las proteínas cuya ausencia o regulación inadecuada causaron transformaciones homeóticas de los segmentos de *Drosophila*. Se piensa que las proteínas de homeodominio activan baterías de genes que especifican las propiedades particulares de cada segmento. Las proteínas de homeodominio incluyen a los productos de ocho genes del complejo homeótico (Hom-C), así como a otras proteínas como Fushi tarazu, Caudal, Distal-less y Bicoid. Las proteínas de homeodominio son importantes en la determinación de los ejes anteroposterior de invertebrados y de vertebrados. En *Drosophila*, la presencia de ciertas proteínas de homeodominio es también necesaria para la determinación de neuronas específicas. Sin estos factores de transcripción, los destinos de estas células neuronales están alterados (Doe y col. 1988).

Estructura del homeodominio

El homeodominio es codificado por una secuencia de DNA de 180 pares de bases conocida como **homeobox** (caja homeótica). El homeodomino parece ser el sitio de unión al DNA de estas proteínas y ellas son críticas en la especificación de los destinos celulares. Por ejemplo, si una proteína quimérica es construida en su mayor parte de Antennapedia pero con el carboxilo terminal (incluido el homeodominio) de Ultrabithorax, ésta puede sustituir a Ultrabithorax y especificar a las células apropiadas como parasegmento 6 (Mann y Hogness 1990). El homeodominio aislado de Antennapedia unirá a los mismos promotores como en la proteína de Antennapedia entera, lo que indica que la unión de esta proteína es dependiente de su homeodominio (Müller y col. 1988).

El homeodomino se pliega en tres a hélices, las últimas dos se pliegan en una conformación hélice-asa-hélice que es característica de los factores de transcripción que se unen al DNA en el surco principal de la doble hélice (Otting y col. 1990; Percival-Smith y col. 1990). La tercera hélice, es la de reconocimiento y es aquí donde el aminoácido toma contacto con las bases de DNA. Un motivo de cuatro bases, TAAT, es conservado en casi todos los sitios reconocidos por los homeodominios; éste probablemente distinga los sitios a los que pueden unirse las proteínas homeodominio. El T terminal 5' parece ser crítico en este reconocimiento, cuando es mutado se destruye toda la unión del homedominio. Los pares de bases que siguen al motivo TAAT son importantes para distinguir entre sitios de reconocimiento semejantes. Por ejemplo, el siguiente par de bases es reconocido por el aminoácido 9 de la hélice de reconocimiento. Estudios de mutación han demostrado que las proteínas homeodominio de Bicoid y de Antennapedia utilizan lisina y glutamina, respectivamente, en la posición 9 para distinguir sitios de reconocimiento relacionados. La lisina del homeodominio de Bicoid reconoce a G del par CG, mientras que la glutamina del homeodominio de Antennapedia reconoce a A del par AT (fig. 9-33; Hanes y Brent 1991). Si la lisina en Bicoid es reemplazada por glutamina, la proteína resultante reconocerá a los sitios de unión de Antennapedia (Hanes y Brent 1989; 1991). Otras proteínas de homeodominio muestran un patrón semejante, en las que una parte del homeodominio reconoce a la secuencia común TAAT, mientras que otra porción reconoce a una estructura específica adyacente a ésta.

Cofactores para los genes Hom-C

Los genes del complejo homeótico de *Drosophila* especifican destinos segmentarios, pero ellos pueden necesitar alguna ayuda para poder hacerlo. Los sitios de unión al DNA reconocidos por los homeodominios de las proteínas Hom-C son muy semejantes y hay alguna superposición en sus especificidades de unión. En 1990, Peifer y Wieschaus descubrieron que el producto del gen *Extradenticle* (*Exd*) interactúa con varias proteínas Hom-C y puede ayudar a especificar identidades segmentarias. Por ejemplo, la proteína Ubx es responsable de la especificación de la identidad del primer segmento abdominal (A1). Sin la proteína Extradenticle, ésta transformará este segmento en A3. Además, las proteínas Exd y Ubx son necesarias para la regulación del gen *decapentaplegic* y la estructura del promotor de *decapentaplegic* sugiere que la proteína Exd puede dimerizarse con la proteína Ubx sobre el potenciador de su gen de interés (Raskolb y Wieschaus 1994; van Dyke y Murre 1994). La proteína Extradenticle incluye un homeodominio; la proteína humana PBX1, que se parece a la proteína Extradenticle, puede tener un papel como un cofactor para los genes homeóticos humanos.

El producto del gen *teashirt* puede además ser un importante cofactor. Este factor de transcripción dedo de zinc es necesario para el funcionamiento de la proteína Sex combs reduced, que distingue entre los segmentos labial y el primer torácico. Éste es crítico para la especificación de la identidad protorácica anterior (parasegmento 3), y puede ser el gen que especifica la condición del "estado del terreno" del complejo homeótico. Si el complejo Bithorax y el gen *Antennapedia* son eliminados, todos los segmentos llegan a ser protórax anterior. El producto del gen *teashirt* parece funcionar con la proteína Scr para distinguir el tórax de la cabeza y funcionar a lo largo del tronco para evitar que se formen estructuras de la cabeza (Roder y col. 1992).

Además del homeodominio, otras regiones de la proteína homeótica son críticas para el desarrollo normal. En efecto, algunas de estas regiones también contactan con el DNA de sus genes de interés y la especificidad de estos dominios de unión no homedominios puede explicar cómo una única proteína homeodominio puede tener diferentes efectos en diferentes tipos de células. Por ejemplo, además de especificar la cutícula ectodérmica, el dominio de expresión de *abdA* también especifica las cámaras del intestino medio del mesodermo visceral. Mediante la producción de proteínas quiméricas entre AbdA y Ubx, Chauvet y col. (2000) demostraron que, mientras que la especificidad epidérmica de la

proteína AbdA reside en su mayor parte en su homeodominio, la especificidad mesodérmica de AbdA reside primariamente en la secuencia de péptidos adyacente cercana al amino terminal.

SITIO WEB 9.9 **Genes homeóticos y sus productos proteicos (Homeotic genes and their protein products).** Los genes Hom-C tienen estructuras fascinantes. Los productos proteicos de estos genes se unen al DNA ante la presencia de otras proteínas que pueden permitirles reconocer secuencias específicas de DNA.

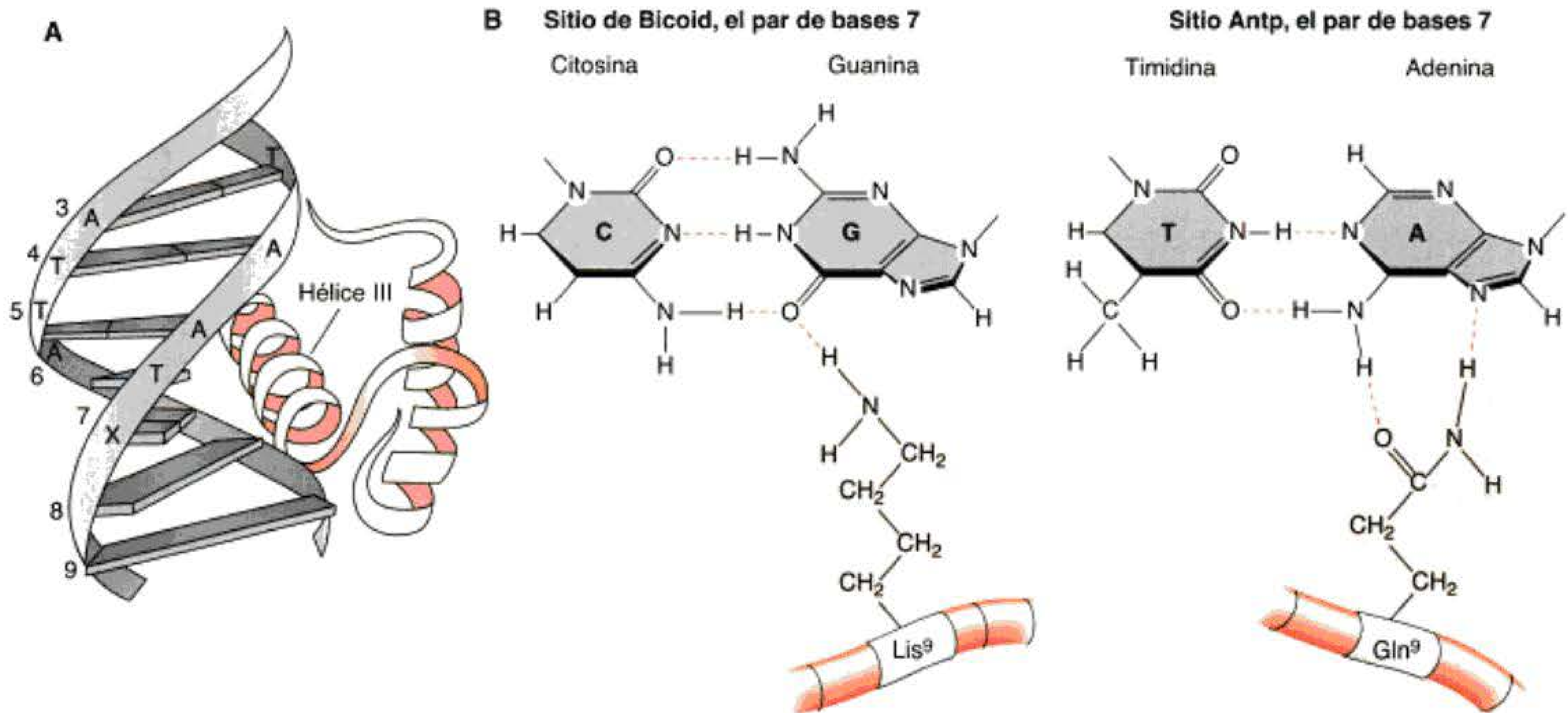


Fig. 9-33. Interacciones DNA-homeodominio. **A.** Secuencia hélice-asa-hélice del homeodominio dentro del surco principal del DNA. **B.** Apareamiento propuesto entre la lisina del homedominio de Bicoid y el par de bases CG de su secuencia de reconocimiento, y entre la glutamina del homeodominio de Antennapedia y el par de bases TA de su secuencia de reconocimiento. En ambos casos, el noveno aminoácido de la hélice del homeodominio se adhiere al par de bases que sigue inmediatamente a la secuencia TAAT. (**A**, según Riddihough 1992; B, según Hanes y Brent 1991.)

GENERACIÓN DE LA POLARIDAD DORSOVENTRAL

En 1936, el embriólogo E. E. Just criticó a los genetistas que trataban de explicar el desarrollo de *Drosophila* examinando mutaciones específicas que afectan el color de ojo, el número de quetas (cerdas o pelos sensoriales) y la forma del ala. Él dijo que no estaba interesado en el desarrollo de las quetas del dorso de la mosca; en su lugar, él quería saber cómo el embrión de la mosca produce su dorso. Cincuenta años más tarde, los embriólogos y los genetistas han respondido finalmente esta pregunta.*

Dorsal: el agente morfogenético para la polaridad dorsoventral

La polaridad dorsoventral se establece por el gradiente de transcripción de un factor denominado **Dorsal**. A diferencia de la proteína Bicoid, cuyo gradiente se establece dentro de un sincitio, Dorsal forma un gradiente sobre un campo de células que es establecido como una consecuencia de eventos de señalización célula-célula.

La especificación del eje dorsoventral tiene lugar en varias etapas. La etapa crítica es la translocación de la proteína Dorsal desde el citoplasma hacia los núcleos de las células ventrales durante el decimocuarto ciclo de división. Anderson y Nüsslein-Volhard (1984) aislaron 11 genes de efecto materno, cada una de cuyas ausencias está asociada con una carencia de estructuras ventrales (fig. 9-34). La ausencia de otro gen de efecto materno, *cactus*, causa la ventralización de todas las células. Las proteínas codificadas por estos genes de efecto materno son críticas para asegurar que la proteína Dorsal entra solo en aquellos núcleos sobre la superficie ventral del embrión.* Después de su translocación, Dorsal actúa sobre los núcleos celulares para especificar las diferentes regiones del embrión. Diferentes concentraciones de la proteína Dorsal en los núcleos parecen especificar diferentes destinos para las células.

* En un modo que Just no podría haber predicho, resulta que algunos de los genes (como *decapentaplegic*) que están involucrados en la regulación del número de quetas (también denominadas cerdas o pelos sensoriales) o en la forma del ala, también tienen funciones tempranas, regulando la polaridad dorsoventral.

* Recordar que un gen en *Drosophila* es generalmente denominado después de su fenotipo mutante. Por lo tanto, el producto del gen *dorsal* es necesario para la diferenciación de las células ventrales. Esto significa que ante la ausencia del gen *dorsal*, las células ventrales llegan a ser dorsalizadas.

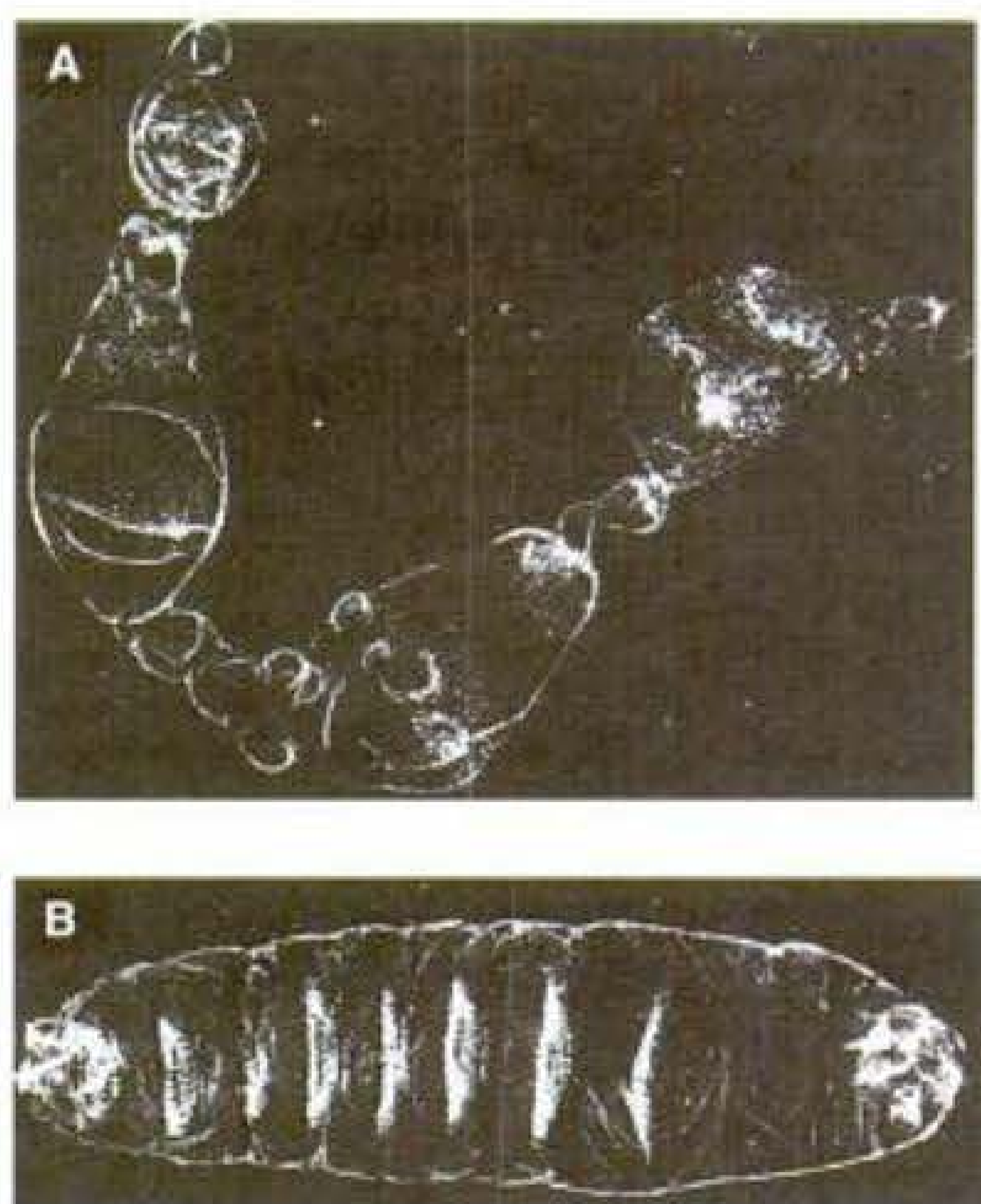


Fig. 9-34. Efectos de las mutaciones que afectan la distribución de la proteína Dorsal. **A.** Larva deformada consistente enteramente de células dorsales. Las larvas como éstas se desarrollan desde huevos de hembras homocigotas para una mutación del gen *snake*, uno de los genes de efecto materno involucrados en la cascada de señalización que establece un gradiente de Dorsal en el embrión. **B.** Larvas desarrolladas desde huevos mutantes de *snake* que recibieron la inyección de mRNA de huevos de tipo salvaje. Estas larvas tienen una apariencia tipo salvaje. (De Anderson y Nüsslein-Volhard 1984; fotografías cortesía de C. Nüsslein-Volhard.)

Translocación de Dorsal al núcleo

La proteína que en realidad distingue dorsal (dorso) de ventral (vientre) es el producto del gen *dorsal*. El transcrito de mRNA del gen dorsal materno es colocado en el ovocito por sus células del ovario. Sin embargo, la proteína Dorsal no es sintetizada desde su mensajero materno hasta cerca de 90 minutos después de la fecundación. Cuando Dorsal es traducida, ésta se halla en todo el embrión, no solo en el lado ventral o dorsal. ¿Cómo puede esta proteína actuar como morfógeno si está localizada en todas las partes del embrión?

En 1989, se encontró la sorprendente respuesta a esta pregunta (Roth y col. 1989; Rushlow y col. 1989; Steward 1989). Mientras que Dorsal es encontrada en todo el blastodermo sincitial del embrión temprano de *Drosophila*, ésta es desplazada sólo hacia los núcleos de la parte ventral del embrión (fig. 9-35A, B). En el núcleo, Dorsal se une a ciertos genes para activar o suprimir su transcripción. Si Dorsal no ingresa en el núcleo, los genes responsables de la especificación de los tipos celulares ventrales (*snail* y *twist*) no son transcritos, los genes responsables para la especificación del tipo celular dorsal (*decapentaplegic* y *zerknüllt*) no son reprimidos y todas las células del embrión llegan a ser especificadas como células dorsales.

Este modelo de formación del eje dorsoventral en *Drosophila* es respaldado por el análisis de mutaciones que dan origen a un fenotipo enteramente dorsalizado o a uno enteramente ventralizado (véanse figs. 9-34A y 9-35). En aquellos mutantes en los que todas las células están dorsalizadas (evidente desde su cutícula dorsal), la proteína Dorsal no ingresa en el núcleo en ninguna célula. Por el contrario, en aquellos mutantes en los que todas las células tienen un fenotipo ventral, Dorsal es hallada en cada núcleo celular.

La cascada de la señal

SEÑAL DESDE El NÚCLEO DEL OVOCITO HACIA LAS CÉLULAS FOLICULARES. Si Dorsal se encuentra en todo el embrión, pero es desplazada hacia los núcleos de las células ventrales, entonces algo más debe proporcionar señales asimétricas. Parece que esta señal es mediada a través de una compleja interacción entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean (fig. 9-36).

El epitelio folicular que rodea al ovocito en desarrollo es inicialmente simétrico, pero su simetría es interrumpida por una señal del núcleo del ovocito. El núcleo del ovocito está localizado al principio en el extremo posterior del ovocito, en el lado opuesto al de las células nodrizas. Éste luego se mueve hacia una posición dorsal anterior y señaliza a las células foliculares que lo recubren para que se conviertan en las células foliculares dorsales

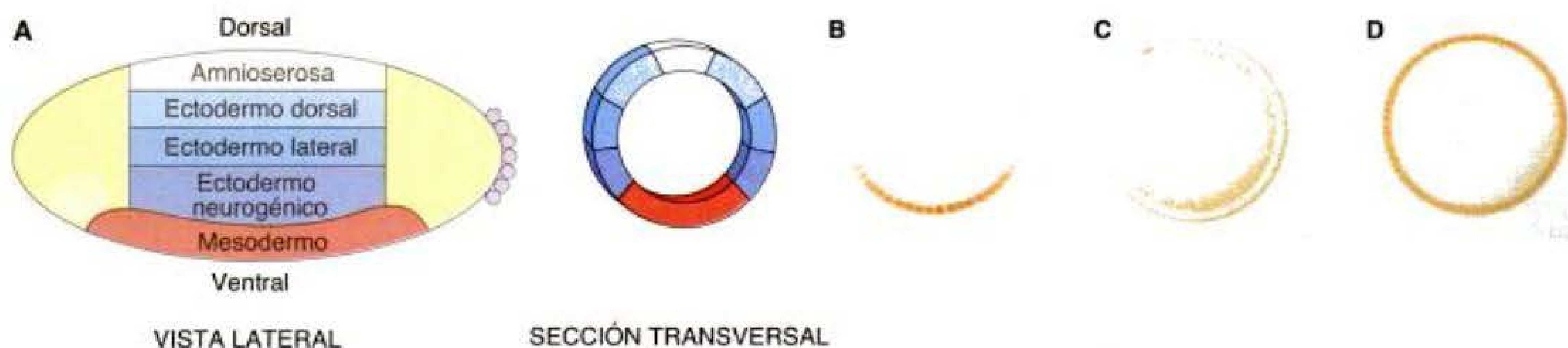


Fig. 9-35. Translocación de la proteína Dorsal hacia los núcleos ventrales, pero no hacia los núcleos laterales o los dorsales. **A.** Mapa de destino a través de una sección transversal lateral del embrión de *Drosophila*. La parte más ventral se convierte en mesodermo; la siguiente porción superior llega a ser el ectodermo neurogénico (ventral). El ectodermo lateral y el dorsal pueden distinguirse en la cutícula, y la región más dorsal llega a ser la amnioserosa, la capa extraembrionaria que rodea al embrión. **B-D.** Secciones transversales de embriones teñidos con anticuerpos para mostrar la presencia de la proteína Dorsal (área de tinción oscura). **B.** Embrión tipo salvaje que muestra a la proteína Dorsal en los núcleos más ventrales. **C.** Mutante dorsalizado, que no muestra la localización de la proteína Dorsal en ningún núcleo. **D.** Mutante centralizado en el que la proteína Dorsal ha ingresado en el núcleo de cada célula. (A, de Rushlow y col. 1989; B-D, de Roth y col. 1989, fotografías cortesía de los autores.)

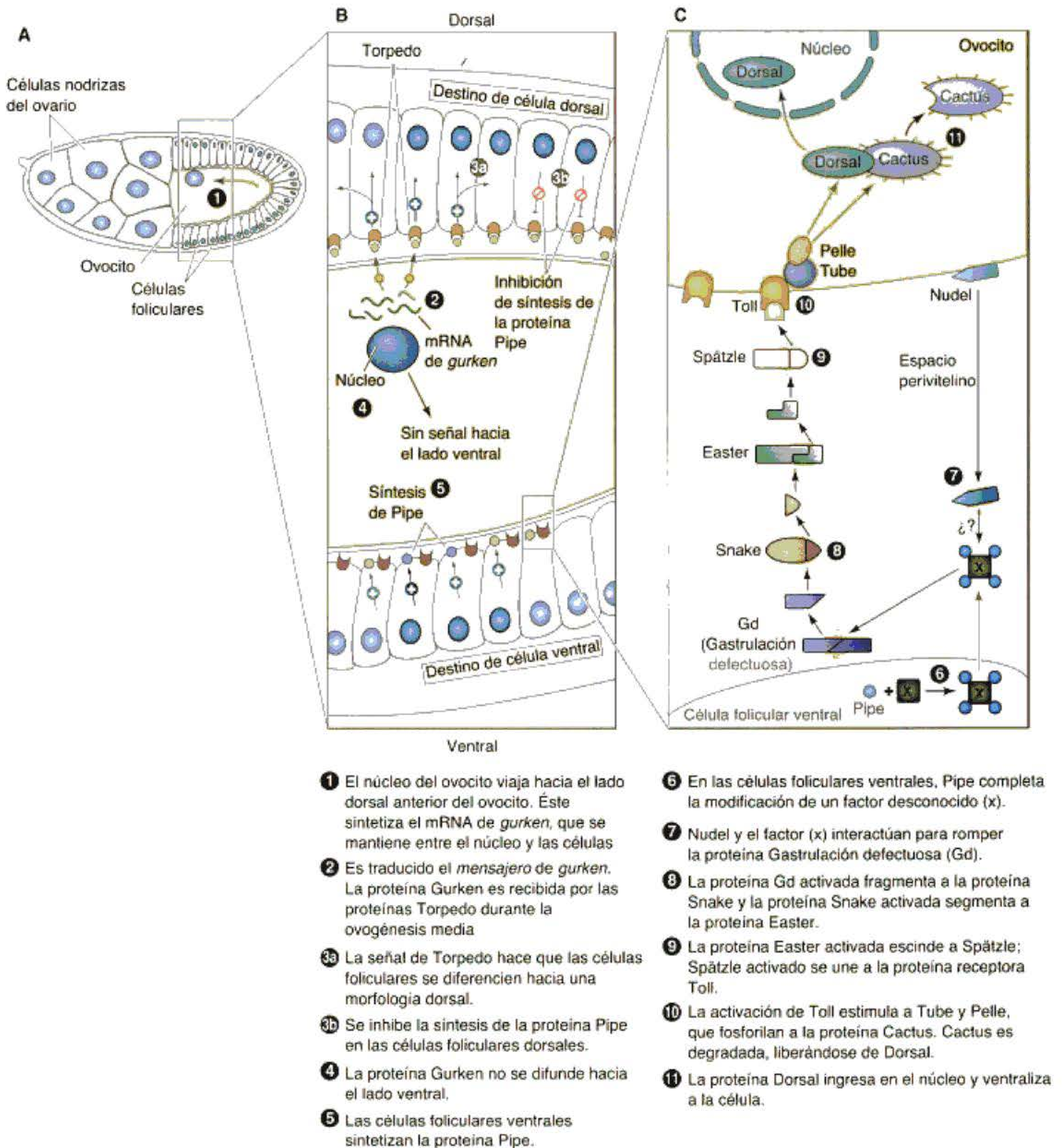


Fig. 9-36. Representación esquemática de la generación de la polaridad dorsal-ventral en *Drosophila*. **A.** El ovocito se desarrolla en un folículo del ovario que consiste en 15 células nodrizas (que abastecen proteínas maternas y *mensajeros* al huevo en desarrollo) y numerosas células foliculares. **B.** El núcleo del ovocito viaja hacia lo que será el lado dorsal del embrión. Los genes *gurken* del ovocito sintetizan mRNA que llega a estar localizado entre el núcleo del ovocito y la membrana celular, donde éste es traducido a proteína Gurken. La señal de Gurken es recibida por la proteína receptora producida por el gen *torpedo* de las células foliculares. Dada la capacidad de difusión de la señal, solo las células foliculares próximas al núcleo del ovocito (es decir, las células foliculares dorsales) reciben esta señal. La señal del receptor Torpedo hace que las células foliculares asuman una morfología folicular dorsal característica y (de algún modo) inhibe la síntesis de la proteína Pipe. Por esta razón, esta proteína es producida solo por las células foliculares ventrales. **C.** Pipe modifica a una proteína desconocida (X) y le permite a ésta ser secretada desde las células foliculares ventrales. La proteína Nudel interactúa con este factor modificado rompiendo el producto de los genes de *grastrulation defective* y *snake* para crear un enzima activa que fragmentará a la forma zimógeno de la proteína Easter en una proteasa Easter activa. La proteasa Easter rompe a la proteína Spätzle en una forma que puede unirse al receptor Toll (que se encuentra a lo largo de la membrana celular embrionaria). Por lo tanto, solo las células ventrales reciben la señal de Toll. Esta señal separa a la proteína Cactus de la proteína Dorsal y permite a Dorsal ser traslocada hacia el núcleo y ventralizar a las células. (Según van Eeden y St. Johnston 1999.)

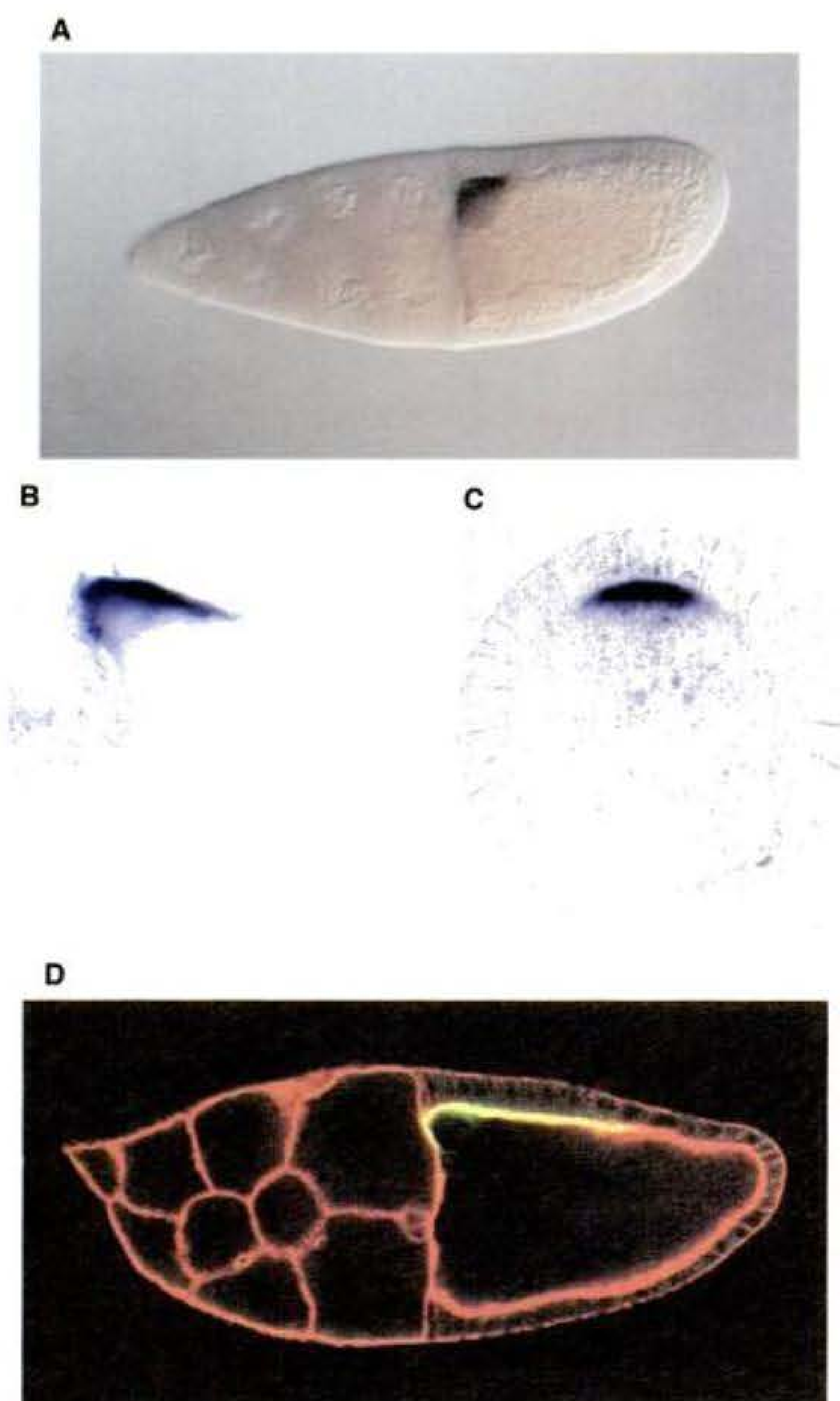


Fig. 9-37. Expresión del *mensajero* de *gurken* y de la proteína entre el núcleo del ovocito y la membrana celular anterior dorsal. **A.** El mRNA de *gurken* está localizado entre el núcleo del ovocito y las células foliculares dorsales del ovario. **B.** La proteína Gurken está localizada de modo semejante (aquí se muestra un estadio más joven que el de A). **C.** Sección transversal del huevo a través de la región de expresión de la proteína Gurken. **D.** Un ovocito más maduro muestra a la proteína Gurken (amarillo) a través de la región dorsal. La actina está teñida de rojo y muestra los límites celulares. A medida que el ovocito crece, las células foliculares migran a través de la parte superior del embrión y llegan a estar expuestas a Gurken. (A de Ray y col. 1996, fotografía cortesía de R. Schüpbach; B y C, de Peri y col. 1999, fotografía cortesía de S. Roth; D, fotografía cortesía de C. van Buskirk y T. Schüpbach.)

más columnares (Montell y col. 1991; Schüpbach y col. 1991; véase fig. 9-11). La señal dorsalizante del núcleo del ovocito es el producto del gen ***gurken***, el único gen conocido que es transcrito desde el núcleo del ovocito haploide (Schüpbach 1987; Forlani y col. 1993). El *mensajero* de *gurken* llega a estar localizado en una medialuna entre el núcleo del ovocito y la membrana celular del ovocito y su producto proteico forma un gradiente anteroposterior a lo largo de la superficie dorsal del ovocito (fig. 9-37; Neuman-Silberberg y Schüpbach 1993). Debido a que puede difundirse una corta distancia, la proteína Gurken alcanza solo las células foliculares cercanas al núcleo del ovocito. Las mutaciones del gen *gurken* en la madre (y por lo tanto en el ovocito) causan la ventralización del embrión y de las células foliculares que lo rodean. (Si la mutación es en las células foliculares y no en el huevo –ovocito– el embrión es normal.)

La señal de Gurken es recibida por las células foliculares a través de un receptor codificado por el gen ***torpedo***. Los análisis moleculares han establecido ahora que *gurken* codifica un homólogo del factor de crecimiento epidérmico de vertebrados (EGF, del inglés, *epidermal groth factor*), mientras que *torpedo* codifica un homólogo del receptor de EGF de vertebrados (Price y col. 1989; Neuman-Silberberg y Schüpbach 1993). La deficiencia materna de *torpedo* causa la ventralización del embrión. Además, el gen *torpedo* es activo en las células foliculares del ovario, no en el embrión. Esto fue descubierto por experimentos con quimeras línea geminal/somática. Schüpbach (1987) trasplantó precursores de las células germinales de embriones tipo salvaje hacia embriones cuyas madres llevaban la mutación de *torpedo*. De manera inversa, trasplantó las células germinales de los mutantes de torpedo hacia los embriones tipo salvaje (fig. 9-38). Los huevos tipo salvaje produjeron embriones mutantes ventralizados cuando se desarrollaban dentro de folículos de madres mutantes de *torpedo*. Los huevos mutantes de *torpedo* eran capaces de producir embriones normales si se desarrollaban dentro de un ovario tipo salvaje. Por lo tanto, a diferencia del producto del gen *gurken*, el gen *torpedo* tipo salvaje es necesario en las células foliculares, pero no en el huevo mismo (ovocito).

SEÑAL DESDE LAS CÉLULAS FOLICULARES HACIA EL CITOPLASMA DEL OVOCITO. La proteína receptora Torpedo activada inhibe la expresión del gen ***pipe***. Como resultado, la proteína Pipe es producida solo en las células foliculares ventrales (Sen y col. 1998; Amiri y Stein 2002). Pipe (de un modo hasta ahora desconocido) activa a la proteína Nudel, que es secretada hacia la membrana celular de las células embrionarias ventrales. Unas pocas horas más tarde en el desarrollo, la proteína Nudel activada inicia la activación de tres serinoproteasas que son secretadas por el embrión hacia el fluido perivitelino (véase fig. 9-36C; Hong y Hashimoto 1995). Estas tres serinoproteasas son los productos de los genes *gastrulación defectuosa* (*gastrulation defective*) (*gd*), *snake* (*snk*) e *easter* (*ea*). Como en la mayoría de las proteasas extracelulares, son secretadas en forma inactiva y activadas por la segmentación del péptido. En una cascada de eventos compleja, la proteína Nudel activada estimula a la proteasa Gastrulación defectuosa. Esta proteasa fragmenta a la proteína Snake, activando a la proteasa Snake, que a su vez fragmenta a la proteína Easter. Esta segmentación activa la proteasa Easter, que fragmenta a la proteína Spätzle (Chasan y col. 1992; Hong y Hashimoto 1995; LeMosy y col. 2001).

La proteína Spätzle segmentada ahora es capaz de unirse a su receptor en la membrana celular del ovocito, el producto del gen *toll*. La proteína Toll es un producto materno distribuida uniformemente en toda la membrana celular del huevo (Hashimoto y col. 1988, 1991), pero ésta solo llega a ser activada mediante la unión de la proteína Spätzle, que es producida únicamente sobre el lado

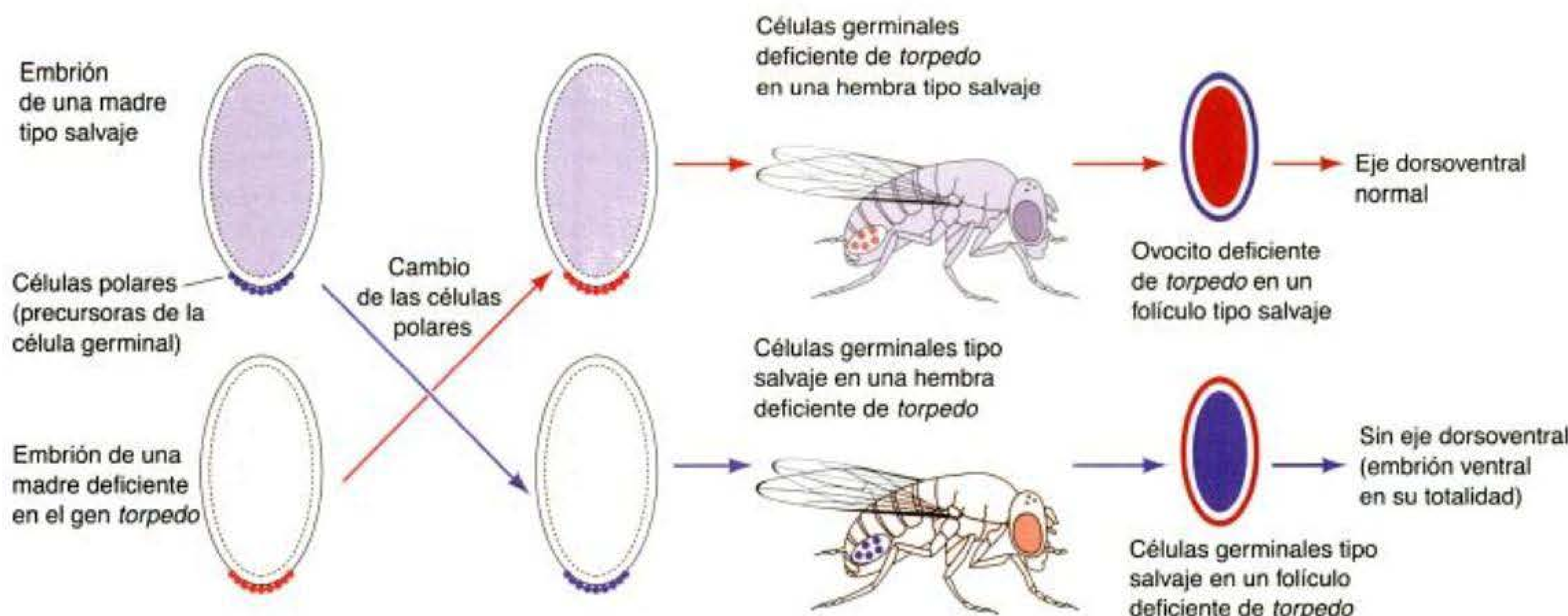


Fig. 9-38. Quimeras de línea germinal producidas mediante el intercambio de células polares (precursoras de la célula germinal) entre embriones tipo salvaje y embriones de madres homocigotas para una mutación del gen *torpedo*. Estos trasplantes producen hembras tipo salvaje cuyos huevos provienen de las madres mutantes y las hembras deficientes de *torpedo* que depositan huevos tipo salvaje. Los huevos deficientes de *torpedo* producen embriones normales cuando son desarrollados en ovarios tipo salvaje, mientras que los huevos tipo salvaje producen embriones ventralizados cuando se desarrollan en ovarios de madres mutantes.

ventral del huevo. Por esta razón los receptores Toll sobre el lado ventral del huevo están transduciendo una señal hacia el huevo, mientras que los receptores Toll sobre el lado dorsal del huevo no lo hacen.

Establecimiento del gradiente del patrón Dorsal

SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DORSAL Y CACTUS. La consecuencia decisiva de la señalización a través de la proteína Toll es el establecimiento de un gradiente de la proteína Dorsal en los núcleos celulares ventrales. ¿Cómo se establece este gradiente? Parece que una proteína denominada Cactus está bloqueando la porción de la proteína Dorsal que le permite a Dorsal ingresar en el núcleo. Mientras la proteína Cactus se le une, la proteína Dorsal se mantiene en el citoplasma. Por lo tanto, la totalidad de este complejo sistema de señales está organizado para separar a la proteína Cactus de la proteína Dorsal en la región ventral del huevo. Cuando Spätzle se une y activa a la proteína Toll, Toll puede activar a la proteína cinasa Pelle. (La proteína Tube es necesaria probablemente para traer a Pelle hacia la membrana celular, donde ésta puede ser activada: Galindo y col. 1995.) La proteína cinasa Pelle activada puede (probablemente a través de un intermediario) fosforilar a Cactus. Una vez fosforilada, la proteína Cactus es degradada y la proteína Dorsal puede entrar al núcleo (Kidd 1992; Shelton y Wasserman 1993; Whalen y Steward 1993; Reach y col. 1996). Debido a que la cascada de transducción de la señal crea un gradiente de la proteína Spätzle que es más elevado en la región ventral, hay un gradiente de translocación de Dorsal en las células ventrales del embrión, con las concentraciones más elevadas de Dorsal en los núcleos celulares más ventrales.

El proceso descrito para la translocación de la proteína Dorsal hacia el núcleo es muy similar al proceso de translocación del factor de transcripción NF-κB hacia el núcleo de los linfocitos de mamíferos. En realidad, hay una considerable homología entre NF-κB y Dorsal, entre I-B y Cactus, entre la proteína Toll y el receptor de interleucina 1, entre la proteína Pelle y una IL-1 –asociada con una proteína cinasa, y entre las secuencias de DNA reconocidas por Dorsal y por NF-κB* (González-Crespo y Levine 1994; Cao y col. 1996). Por lo tanto, la vía bioquímica utilizada para especificar la polaridad dorsoventral en *Drosophila* parece ser homóloga a la utilizada para diferenciar linfocitos en los mamíferos (fig. 9-39).

EFECTOS DEL GRADIENTE DE LA PROTEÍNA DORSAL. ¿Qué hace la proteína Dorsal una vez localizada en los núcleos de las células ventrales? Una mirada al mapa de destino de una sección transversal a través del embrión de *Drosophila* en el ciclo 14 de división (véase fig. 9-35A) hace que sea obvio que las 16 células con las concentraciones más elevadas de Dorsal son las que generan el mesodermo. La siguiente célula por arriba de esta región genera la glía especializada y las células neuronales de la línea media. Las dos células siguientes son las que dan origen a la epidermis ventral y al cordón nervioso ventral, mientras que las 9 células por arriba de éstas producen la epidermis dorsal. El grupo más dorsal de 6 células genera la amnioserosa que cubre al embrión (Ferguson y Anderson 1991).

Este mapa de destino es generado por el gradiente de la proteína Dorsal en los núcleos. Grandes cantidades de Dorsal instruyen a las células a convertirse en mesoder-

* Lemaitre y col. (1996) han demostrado que Toll y su ligando (Spätzle) están también involucrados en la respuesta inmune de *Drosophila* contra las infecciones por hongos (micóticas). Además, varios genes relacionados con *toll* han sido descubiertos en seres humanos, que pueden estar involucrados en la respuesta inmune y en el desarrollo temprano (Rock y col. 1998; Qureshi y col. 1999).

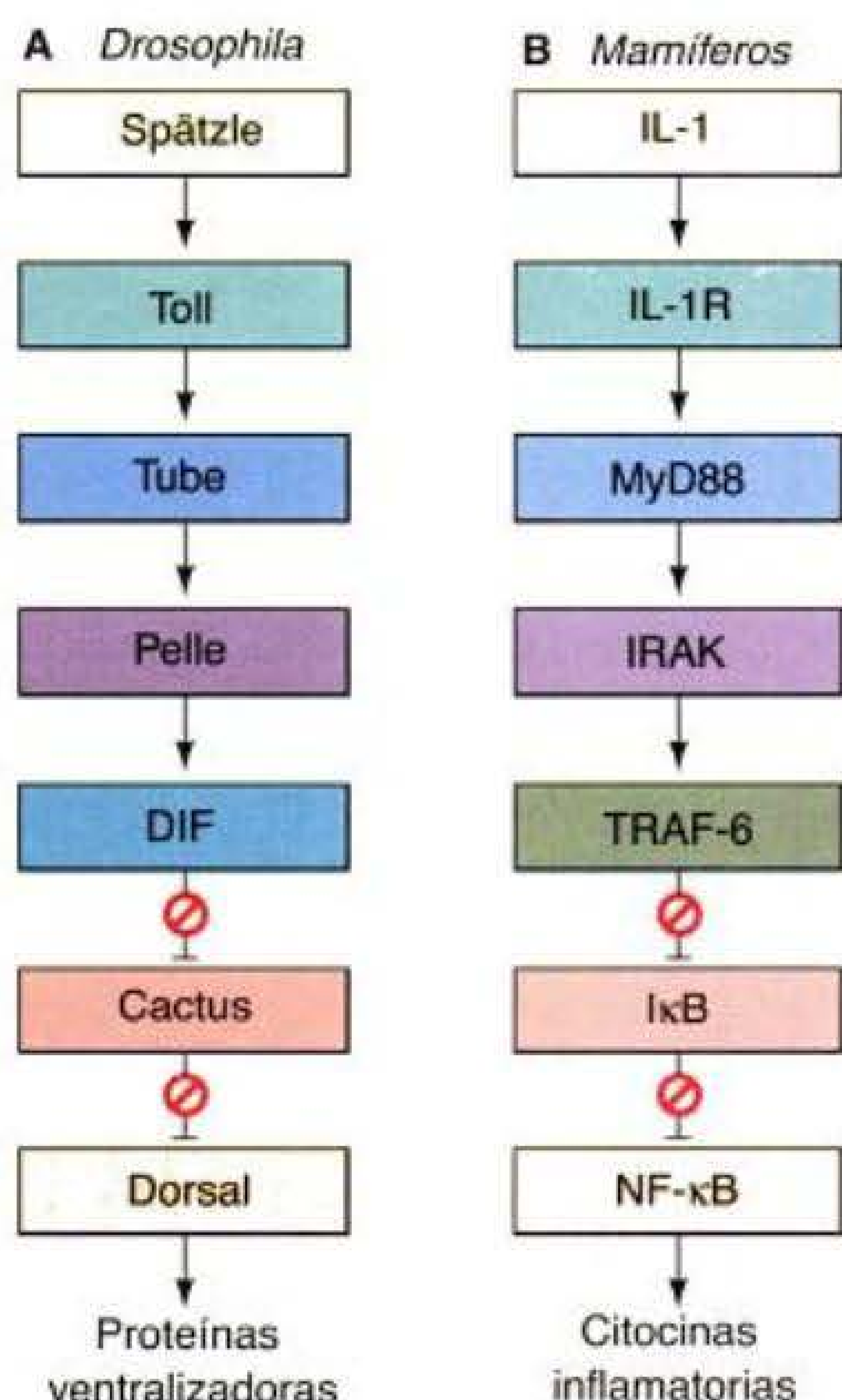


Fig. 9-39. Modelo de una vía conservada para la regulación del transporte nuclear de los factores de transcripción en *Drosophila* y en mamíferos. **A.** En *Drosophila*, la proteína Toll une la señal de la proteína Spätzle y activa la región cinasa de la proteína Pelle (probablemente con la ayuda de la proteína Tube). La proteína Pelle fosforila a Cactus y a Dorsal (a través del factor de inmunidad relacionado con dorsal, DIF, del inglés, *dorsal-related immunity factor*), provocando que las dos proteínas se separen entre sí. La proteína Dorsal a continuación puede ingresar en el núcleo y regular la transcripción de genes específicos ventrales. **B.** En los linfocitos de mamíferos, el receptor IL-1 puede causar la fosforilación de IκB (a través de una cascada que involucra a la cinasa IRAK). Esto le permite a la proteína NF-κB ingresar en el núcleo y efectuar la transcripción de varios genes específicos de linfocitos involucrados en la respuesta inflamatoria. Los colores particulares indican proteínas homólogas en estas vías homólogas. (Según Qureshi y col. 1999.)

mo, mientras que menores cantidades instruyen a las células a convertirse en gliales o tejido ectodérmico (Jiang y Levine 1993). El primer evento morfogenético de la gastrulación de *Drosophila* es la invaginación de las 16 células más ventrales del embrión (fig. 9-40). Todos los músculos del cuerpo, células adiposas y gónadas derivan de estas células mesodérmicas (Foe 1989). La proteína Dorsal especifica a estas células de dos modos para llegar a ser mesodermo. En primer lugar, Dorsal activa a genes específicos que crean el fenotipo mesodérmico. Tres de estos genes blanco de interés para Dorsal son *twist*, *snail* y *rhomboid* (fig. 9-41). Estos genes son transcritos solamente en los núcleos que han recibido altas concentraciones de la proteína Dorsal, debido a que sus potenciadores no se unen a Dorsal con una afinidad muy elevada (Thisse y col. 1988, 1991; Jiang y col. 1991; Pan y col. 1991). La proteína Twist activa a genes mesodérmicos, mientras que la proteína Snail reprime a genes particulares no mesodérmicos que de otro modo podrían ser activos. El gen *rhomboid* es interesante debido a que es activado por Dorsal pero reprimido por Snail. Por lo tanto, *rhomboid* no es expresado en las células más ventrales (es decir, los precursores mesodérmicos), pero es expresado en las células adyacentes del mesodermo que forman el ectodermo neural presuntivo (fig. 9-41; Jiang y Levine 1993). Snail y Twist son necesarias para completar el fenotipo mesodérmico y para una adecuada gastrulación (Leptin y col. 1991b). El borde nítido entre las células mesodérmicas y las células adyacentes a éstas que generan células gliales (mesectodermo) es producido por la presencia de Snail y Twist en las células más ventrales, pero solo de Twist en la siguiente célula hacia arriba (Kosman y col. 1991). En los mutantes de *snail*, las células más ventrales todavía tienen al gen *twist* activado y ellas se asemejan a las células más laterales (Nambu y col. 1990).

Mientras tanto, niveles intermedios de Dorsal nuclear activan la transcripción del gen *short gastrulation* (gastrulación breve) (*sog*) en dos bandas laterales que se encuentran a los lados del dominio de expresión ventral de twist, cada uno de 12 a 14 células

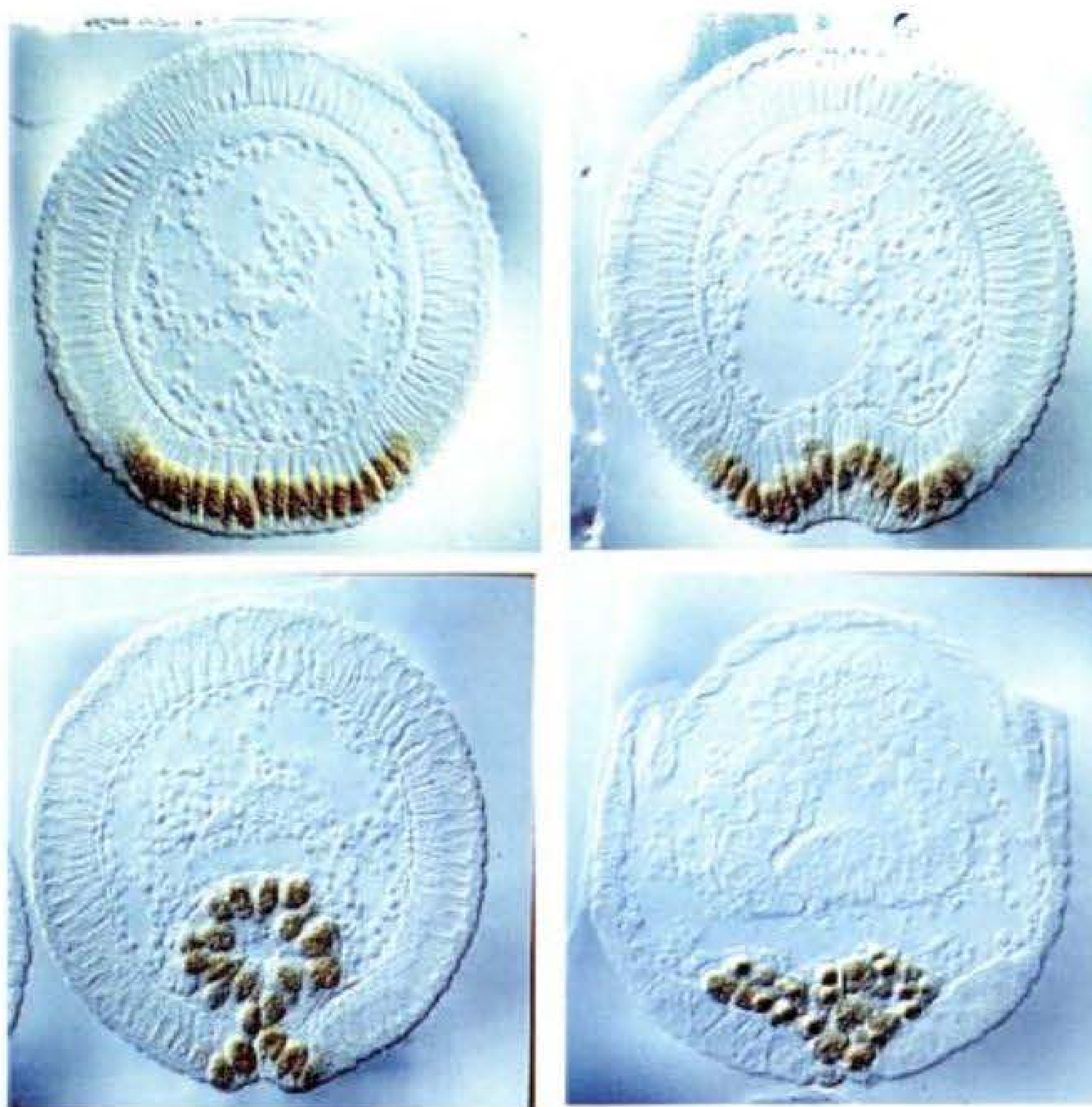
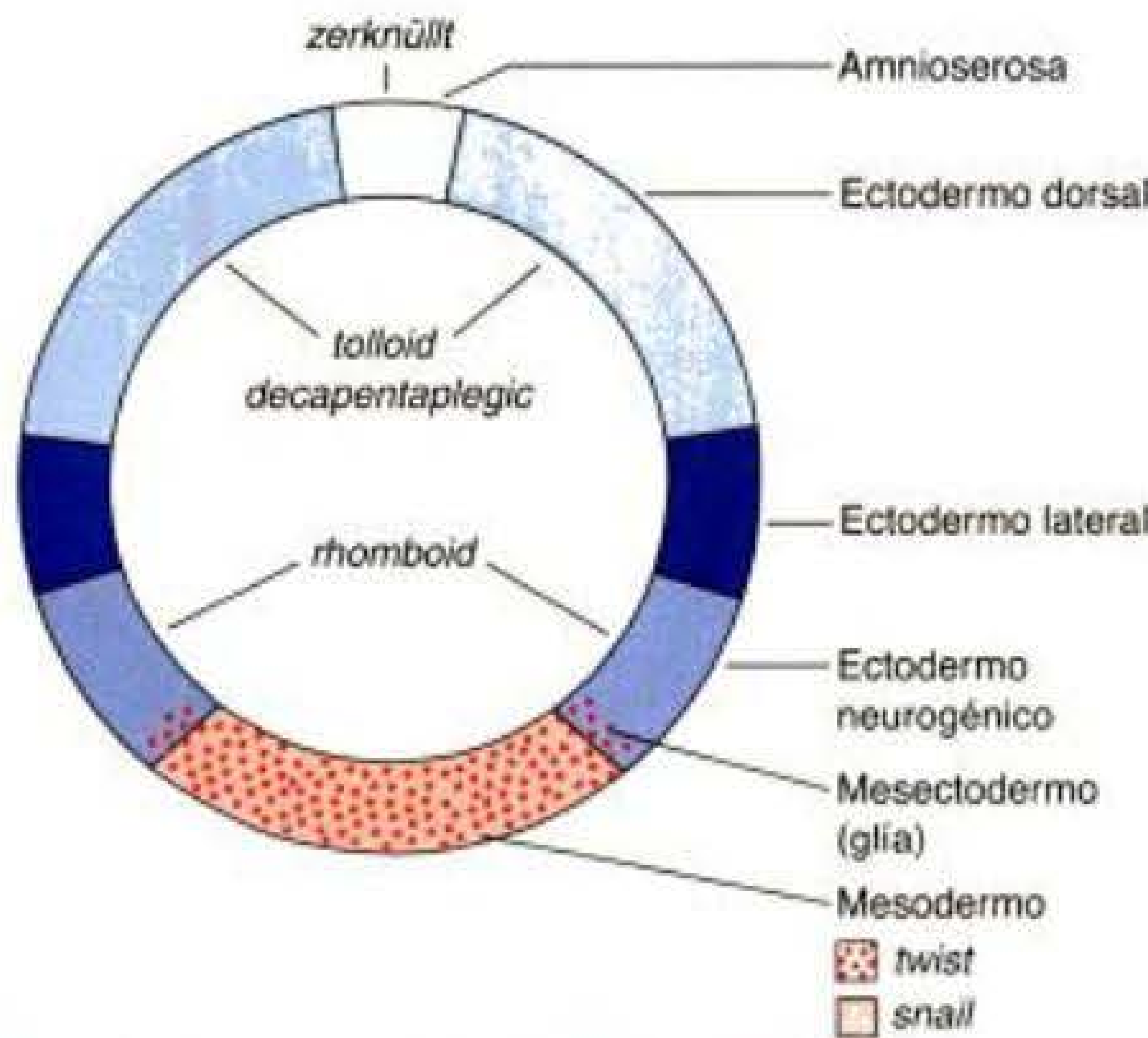


Fig. 9-40. Gastrulación en *Drosophila*. En esta sección transversal, las células mesodérmicas en la porción ventral del embrión se tuercen hacia adentro y forman un tubo, que luego se aplana y genera los órganos mesodérmicos. Los núcleos están teñidos con anticuerpos para la proteína Twist. (De Leptin 1991a; fotografías cortesía de M. Leptin.)

A ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN DORSAL



B ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN VENTRAL

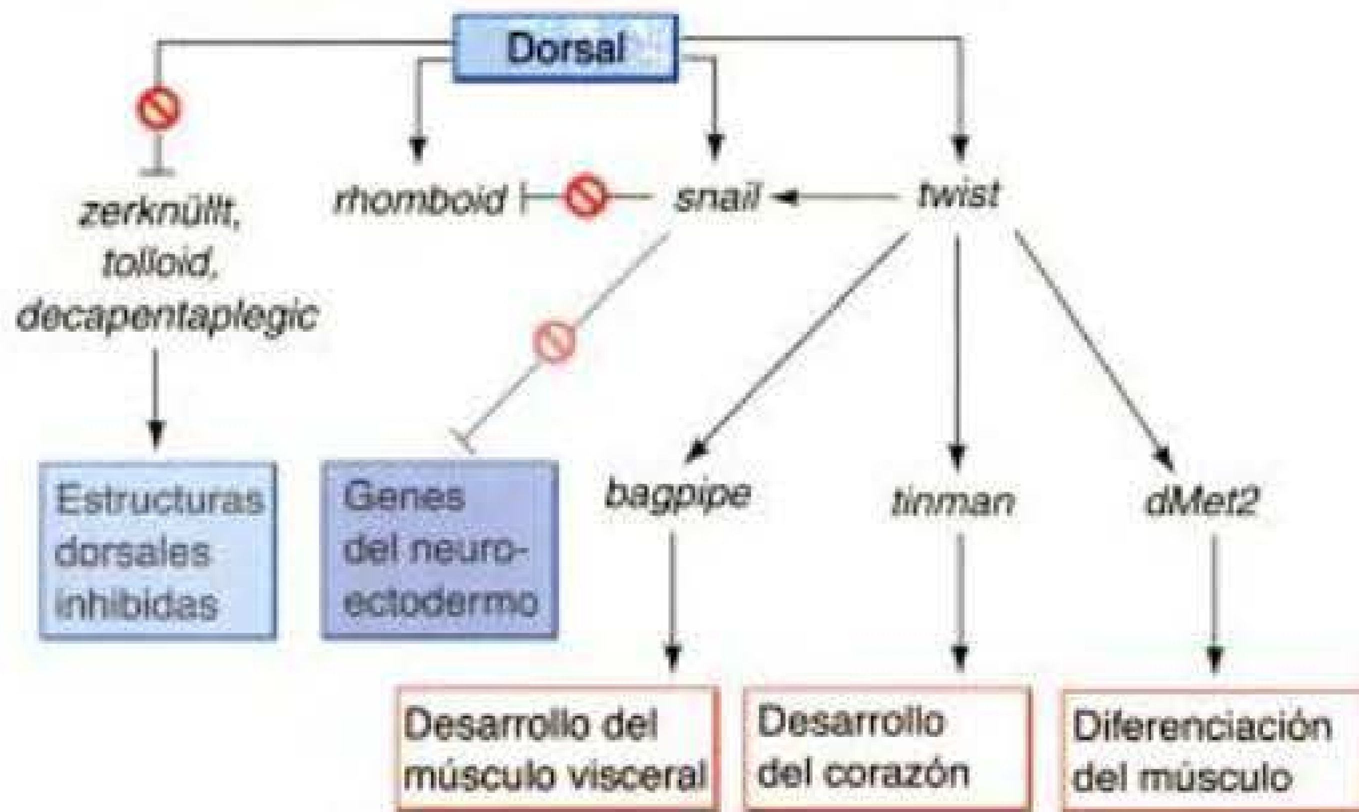


Fig. 9-41. Subdivisión del eje dorsoventral de *Drosophila* por el gradiente de la proteína Dorsal en los núcleos. **A.** La proteína Dorsal activa a los genes cigóticos *rhomboid, twist* y *snail*, que dependen de su concentración nuclear. El mesodermo se forma donde Twist y Snail están presentes y las células gliales se forman donde interactúan Twist y Rhomboid. Las células con Rhomboid, pero sin Snail o Twist, forman el ectodermo neurogénico. **B.** Interacciones en la especificación de la porción ventral del embrión de *Drosophila*. La proteína Dorsal inhibe los genes que podrían dar origen a estructuras dorsales (*tolloid, decapentaplegic* y *zerknüllt*) mientras que activa a tres genes ventrales. La proteína Snail, formada más centralmente, inhibe la transcripción de *rhomboid* y evita la formación de ectodermo. Twist activa a *dMet2* y *bagpipe* (que activan la diferenciación muscular) así como a *tinman* (desarrollo de músculo cardíaco). (**A**, según Steward y Govind 1993; **B**, según Furlong y col. 2001.)

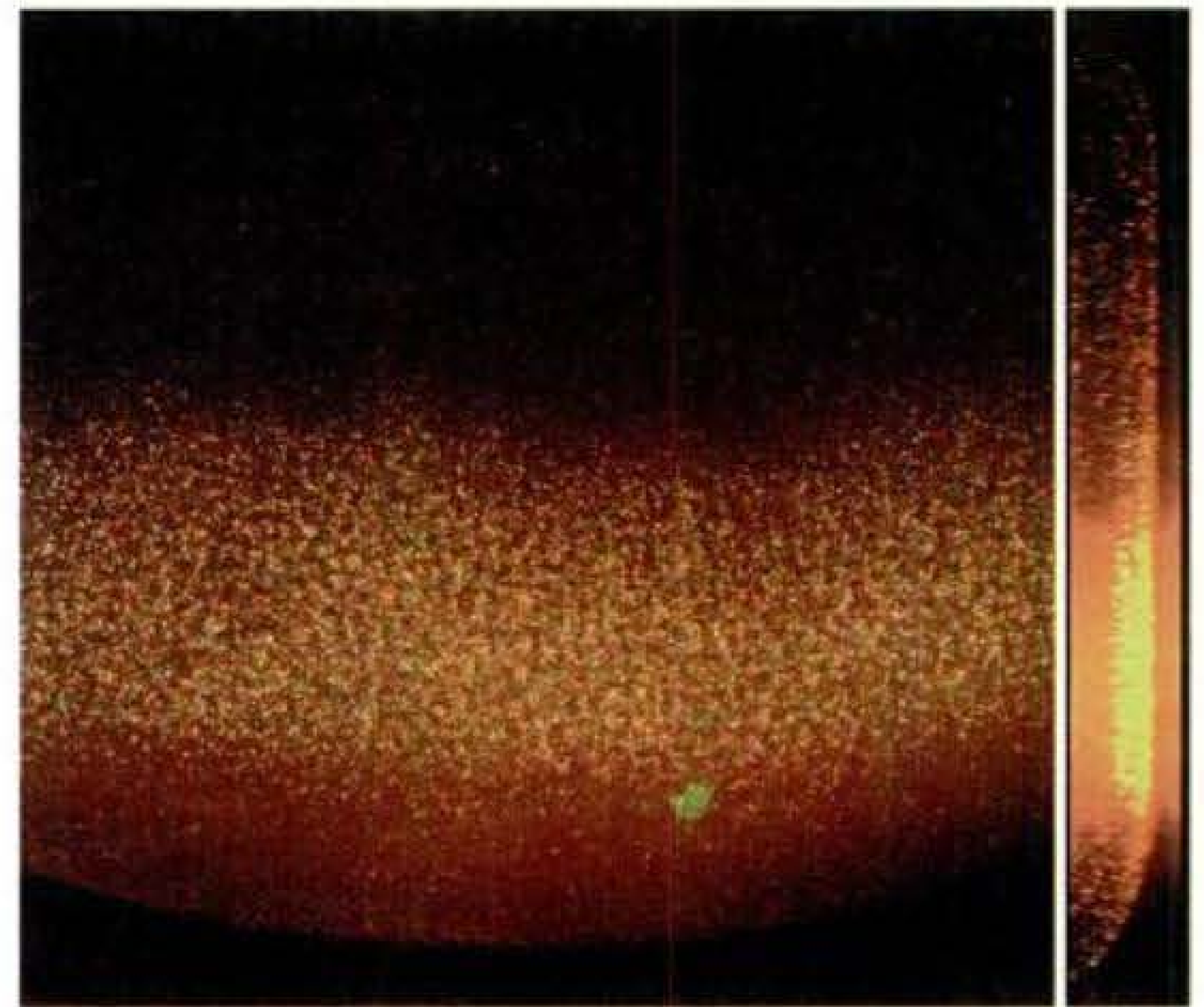


Fig. 9-42. Productos del gen *short gastrulation*. El mRNA para *sog* (amarillo) es transcrito solamente en la región ventral del blastodermo, la región que es destinada para llegar a ser el ectodermo neural. La proteína (rojo) sintetizada desde el mensajero *sog* es hallada predominantemente en las células destinadas a convertirse en ectodermo neural y las células por debajo de esta región están destinadas a convertirse en mesodermo. La proteína Short gastrulation es degradada en las células más dorsales que llegarán a ser la epidermis de la larva. La figura del costado es una imagen reconstruida por computadora de un embrión blastodermo tardío visto en una sección transversal (rotada 90° desde la imagen más grande). Ésta muestra el gradiente ventral-hacia-dorsal de la proteína Sog. (Según Srinivasan y col. 2002; fotografías cortesía de E. Bier).

de ancho (fig. 9-42; François y col. 1994; Srinivasan y col. 2002). El gen *sog* codifica una proteína que impide que el ectodermo de esta región se convierta en hipodermis y comience el proceso de diferenciación neural.

La proteína Dorsal también determina directamente al mesodermo. Además de activar a genes que estimulan mesodermo (*twist* y *snail*), inhibe directamente a los genes dorsalizantes *zerknüllt* (*zen*) y *decapentaplegic* (*dpp*). Por lo tanto, en las mismas células, Dorsal puede actuar como un activador de algunos genes y como represor de otros. Si la proteína Dorsal activa o reprime a un gen dado depende de la estructura de los potenciadores de los genes. El potenciador de *zen* posee una región silenciadora que contiene un sitio de unión para Dorsal y un segundo sitio de unión para otras dos proteínas de unión al DNA. Estas otras dos proteínas le permiten a la proteína Dorsal unir una proteína represora transcripcional (Groucho) y traerla hacia el DNA (Valentine y col. 1998). Los mutantes de *dorsal* expresan los genes *dpp* y *zen* en todo el embrión (Rushlow y col. 1987) y los embriones deficientes en *dpp* y *zen* no pueden formar estructuras dorsales (Irish y Gelbart 1987). Por lo tanto, en embriones tipo salvaje, los precursores mesodérmicos expresan *twist* y *snail* (pero no *zen* o *dpp*); los precursores de la epidermis dorsal y de la amnioserosa expresan *zen* y *dpp* pero no *twist* o *snail*. Los precursores gliales (mesectodermo) expresan *twist* y *rhomboid*, mientras que los precursores del ectodermo neural lateral no expresan a ninguno de estos cuatro genes (Kosman y col. 1991; Ray y Schüpbach 1996). Por lo tanto, como consecuencia de la respuesta del gradiente de la proteína Dorsal, el eje llega a ser subdividido en mesodermo, mesectodermo, ectodermo neurogénico, epidermis y amnioserosa.

Ejes y primordios de órganos: el modelo de coordenada cartesiano

Los ejes anteroposterior y dorsoventral de los embriones de *Drosophila* forman un sistema de coordenada que puede utilizarse para especificar posiciones dentro del

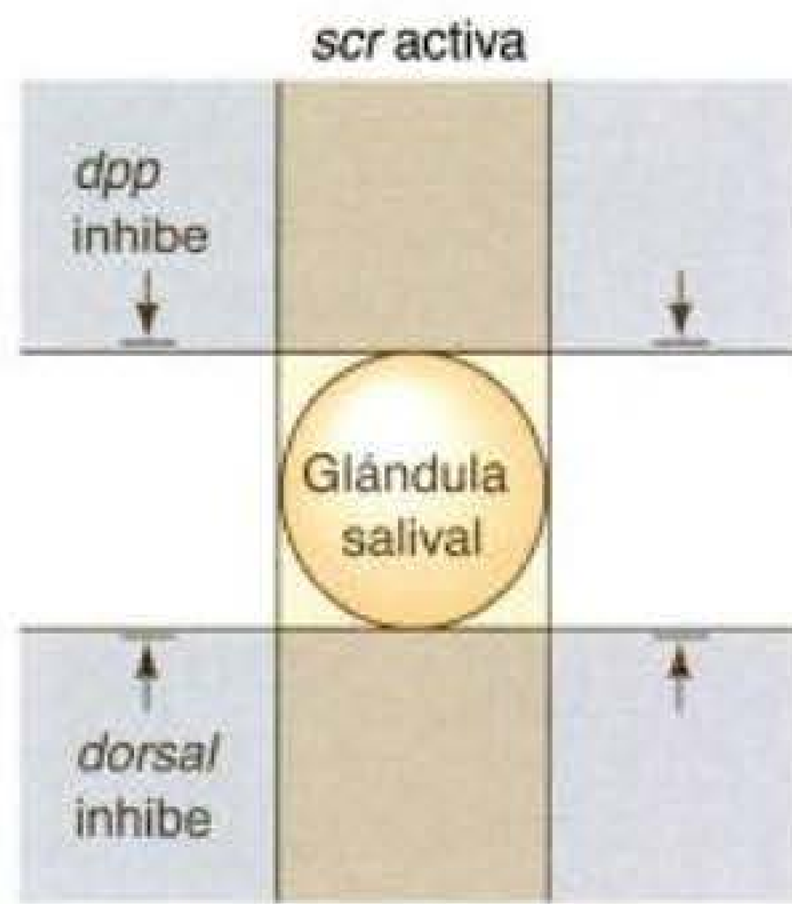


Fig. 9-43. Sistema de coordenada cartesiana para la expresión de genes que dan origen a las glándulas salivales en *Drosophila*. Estos genes son activados por el producto proteico del gen homeótico *sex combs reduced* (*scr*) en una banda estrecha a lo largo del eje anteroposterior y son inhibidos en las regiones marcadas por los productos génicos de *decapentaplegic* (*dpp*) y *dorsal* a lo largo del eje dorsoventral. Este patrón le permite a las glándulas salivales formarse en la línea media del embrión en el segundo parasegmento. (Según Panzer y col. 1992.)

embrión. Teóricamente, las células que son inicialmente equivalentes en el potencial de desarrollo pueden responder a sus posiciones mediante la expresión de diferentes grupos de genes. Este tipo de especificación ha sido demostrado en la formación de los rudimentos de la glándula salival (Panzer y col. 1992; Bradley y col. 2001; Zhou y col. 2001).

Las glándulas salivales de *Drosophila* se forman solamente en la banda de células definida por la actividad del gen *sex combs reduced* (*scr*) a lo largo del eje anteroposterior (parasegmento 2). No se forman glándulas salivales en los mutantes deficientes de *scr*. Además, si *scr* es expresado experimentalmente en todo el embrión, se forma el primordio de la glándula salival en una banda ventrolateral a lo largo de la mayoría de la longitud del embrión. La formación de las glándulas salivales a lo largo del eje dorsoventral está reprimida por Decapentaplegic y Dorsal. Estas proteínas inhiben la formación de la glándula salival y dorsal y ventralmente. Por lo tanto, las glándulas salivales se forman en la intersección de la banda de expresión vertical de *scr* (parasegmento 2) y la región horizontal en la línea media de la circunferencia del embrión que no tienen los productos génicos de Decapentaplegic ni de Dorsal (fig. 9-43). Las células que forman las glándulas salivales son dirigidas a hacer esto debido a las actividades de los genes de intersección a lo largo de los ejes anteroposterior y dorsoventral.

Una situación semejante es vista con tejidos que son hallados en cada segmento de la mosca. Los neuroblastos se originan a partir de diez grupos de cuatro a seis células cada uno de los cuales se forma a cada lado en cada segmento en la banda de ectodermo neural en la línea media del embrión (Skeath y Carroll 1992). El potencial para formar células neurales es conferido sobre estas células por medio de la expresión de los genes proneurales del complejo génico achaete-scute: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*) y *letal of scute* (*l'sc*). Las células en cada grupo interactúan (a través de la vía Notch detallada en el cap. 6) para generar una única célula neural a partir del grupo. Skeath y col. (1993) han demostrado que el patrón de transcripción de *achaete* y de *scute* es impuesto por un sistema de coordenadas. Sus expresiones son reprimidas por las proteínas Decapentaplegic y Snail a lo largo del eje dorsoventral, mientras que la potenciación positiva por los genes pair-rule a lo largo del eje anteroposterior causa su repetición en cada mitad de segmento. El potenciador reconocido por estas proteínas especificadoras de eje se localiza entre los genes *achaete* y *scute* y parece regular a ambos. Es muy probable, entonces que las posiciones de los primordios de los órganos sean especificadas en toda la mosca a través de un sistema de coordenadas bidimensional basado en la intersección de los ejes anteroposterior y dorsoventral.

Cierre

Los estudios genéticos en el embrión de *Drosophila* han sacado a la luz numerosos genes que son responsables de la especificación de los ejes anteroposterior y dorsoventral. Se está lejos de un entendimiento completo de la formación del patrón de *Drosophila*, pero somos más concientes de su complejidad de lo que éramos cinco años atrás. Las mutaciones de los genes de *Drosophila* nos han dado una primera visión de los múltiples niveles de la regulación del patrón en un organismo complejo y nos han permitido aislar estos genes y sus productos. Además, como se verá en los próximos capítulos, estos genes proporcionan claves para un mecanismo general de formación de patrón utilizado en todo el reino animal.

Se está comenzando a aprender cómo el genoma influye en la formación de un organismo. Los genes que regulan la formación del patrón en *Drosophila* funcionan de acuerdo con ciertos principios.

- Hay *morfógenos* –como Bicoid y Dorsal– cuyos gradientes determinan la especificación de diferentes tipos celulares. Estos morfógenos pueden ser factores de transcripción.
- Hay un *orden temporal* por el cual diferentes tipos de genes son transcritos y los productos de un gen con frecuencia regulan la expresión de otro gen.
- Los *límites* de expresión de un gen pueden crearse mediante la interacción entre factores de transcripción y su gen blanco de interés. Aquí, los factores de transcripción que se transcriben más temprano regulan la expresión del siguiente grupo de genes.
- El *control traduccional* es extremadamente importante en el embrión temprano y los mRNA localizados son críticos en el establecimiento del patrón del embrión.
- Los destinos celulares individuales no son definidos inmediatamente. En su lugar, hay una especificación gradual por medio de la cual un determinado campo es dividido y subdividido, regulando finalmente destinos celulares individuales.

Resumen: desarrollo de Drosophila y especificación del eje

1. La segmentación de *Drosophila* es superficial. Los núcleos se dividen 13 veces antes de formar células. Antes de la formación celular, los núcleos se localizan en un blastodermo sincitial. Cada núcleo es rodeado por citoplasma lleno de actina.
2. Cuando se forman las células, el embrión de *Drosophila*, experimenta una transición a blástula media, por medio de la cual la segmentación llega a ser asincrónica y se produce nuevo mRNA. La cantidad de cromatina determina el tiempo de esta transición.
3. La gastrulación comienza con la invaginación de la región más ventral (el mesodermo presuntivo), que causa la formación de un surco ventral. La banda germinal se expande de modo tal que los segmentos de la futura región posterior se tuercen justo detrás de la cabeza presuntiva.
4. Los genes de efecto materno son responsables de la iniciación de la polaridad anteroposterior. El mRNA de *bicoid* es unido al citoesqueleto en el futuro polo anterior por su 3' UTR; el mRNA de *nanos* es secuestrado en el futuro polo posterior por su 3' UTR. Los mensajeros de *hunchback* y *caudal* son vistos en todo el embrión.
5. En la fecundación son traducidos los mensajeros de *bicoid* y *nanos*. Un gradiente de la proteína Bicoid activa la transcripción de más *hunchback* en la región anterior. Además, Bicoid inhibe la traducción del mRNA de *caudal*. Un gradiente de Nanos en la región posterior inhibe la traducción del mRNA de *hunchback*. La proteína Caudal es producida en la región posterior.
6. Las proteínas Bicoid y Hunchback activan a los genes responsables de la parte anterior de la mosca; Caudal activa a los genes responsables para el desarrollo de la parte posterior.
7. Las extremidades anterior y posterior sin segmentar son reguladas por la activación de la proteína Torso en los polos anterior y posterior del huevo.
8. Los genes gap responden a la concentración de proteínas de los genes de efecto materno. Sus productos proteicos interactúan entre sí de modo tal que cada proteína del gen gap define regiones específicas del embrión.
9. Las proteínas del gen gap activan o reprimen a los genes pair-rule. Los genes pair-rule tienen promotores modulares de modo tal que ellos llegan a activarse en siete "bandas". Sus límites de transcripción son definidos por los genes gap. Los genes pair-rule forman siete bandas de transcripción a lo largo del eje anteroposterior, comprendiendo cada una a dos parasegmentos.
10. El producto del gen pair-rule activa la expresión de *engrailed* y *wingless* en células adyacentes. Las células que expresan *engrailed* forman el límite anterior de cada parasegmento. Estas células forman un centro señalizador que organiza la formación de la cutícula y la estructura segmentaria del embrión.
11. Los genes selectores homeóticos son hallados en dos complejos sobre el cromosoma 3 de *Drosophila*. Juntas, estas regiones son denominadas Hom-C, el complejo de genes homeóticos. Los genes están organizados en el mismo orden que su expresión transcripcional. Los genes Hom-C especifican a segmentos individuales y las mutaciones en estos genes son capaces de transformar a un segmento en otro.
12. La expresión de cada gen selector homeótico es regulada por los genes gap y pair-rule. Sus expresiones son refinadas y mantenidas mediante interacciones por las cuales sus productos proteicos evitan la transcripción de los genes Hom-C vecinos.
13. En las mutaciones *Ultrabithorax*, el tercer segmento torácico llega a ser especificado como el segundo segmento torácico. Esto convierte a los halterios en alas. Cuando *Antennapedia* es expresada en la cabeza así como en el tórax, reprime la formación de la antena, y permite que se formen patas donde debería haber antenas.
14. Los blancos de interés de las proteínas Hom-C son los genes realizadores. Estos genes incluyen a *distal-less* y *wingless* (en los segmentos torácicos).
15. La polaridad dorsoventral es regulada por la entrada de la proteína Dorsal en el núcleo. La polaridad dorsoventral es iniciada cuando el núcleo se mueve hacia la región dorsoanterior del ovocito y transcribe al mensajero de *gurken*. El mensajero de *gurken* es luego transportado a la región por arriba del núcleo y adyacente a las células foliculares.
16. El mRNA de *gurken* es traducido a proteína Gurken, que es secretada desde el ovocito y se une a su receptor, Torpedo, sobre las células foliculares. Ésta dorsaliza a las células foliculares, evitando que sinteticen Pipe.
17. La proteína Pipe en las células foliculares ventrales modifica a un factor todavía desconocido que modifica a la proteína Nudel. Esta modificación le permite a Nudel activar una cascada de proteólisis en el espacio entre las células foliculares ventrales y las células ventrales del embrión.
18. Como resultado de esta cascada, la proteína Spätzle es activada y se une a la proteína Toll sobre las células embrionarias ventrales.
19. La proteína Toll activada estimula a Pelle y Tube para fosforilar a la proteína Cactus, que estába unida a la proteína Dorsal. Cactus fosforilada es degradada, permitiéndole a Dorsal ingresar al núcleo.
20. Una vez en el núcleo, Dorsal activa a los genes responsables de los destinos celulares ventrales y reprime los genes cuyas proteínas podrían especificar destinos celulares dorsales. Debido a que un gradiente de proteína Dorsal ingresa a varios núcleos, aquellos en la superficie más ventral llegan a ser mesodermo y los más laterales llegan a ser ectodermo neurogénico.
21. Los órganos se forman en la intersección de las regiones de expresión génica dorsoventral y anteroposterior.

Driever, W. and C. Nüsslein-Volhard. 1988b. A gradient of Bicoid protein in Drosophila embryos. Cell 54: 83-93.

Driever, W. and C. Nüsslein-Volhard. 1989. The Bicoid protein is a positive regulator of hunch-back transcription in the early Drosophila embryo. Nature 337: 138-143.

Driever, W., G. Thoma and C. Nisslein-Volhard. 1989. Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the Drosophila embryo by the affinity of binding sites for the Bicoid morphogen. Nature 340: 363-367.

Driever, W., V. Siegel and C. Nusslein-Volhard. 1990. Autonomous determination of anterior structures in the early Drosophila embryo by the Bicoid morphogen. Development 109: 811-820.

Edgar, B. A. and P. H. O'Farrell. 1989. Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. Cen 57: 177-187.

Edgar, B. A., C. P. Kiehle and G. Schubiger. 1986a. Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early Drosophila development. Cell Edgar, B. A., M. P. Weir, G. Schubiger and T. Kornberg. 1986b. Repression and turnover pattern offushi tarazu RNA in the early Drosophila embryo. Cell 47: 747-754.

Ferguson, E. L and K. V. Anderson. 1991. Dorsal-ventral pattern formation in the Drosophila embryo: The role of zygotically active genes. Curr. Top. Dev. Biol. 25: 17-43.

Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof and C. Nusslein-Volhard. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-Stufen ribonucleoprotein particles.EMBO J. 16: 1751-1758.

Finkelstein, R. and N. Perrimon.1990. The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies Drosophila head development. Nature 346: 485-488.

Foe, V. E. 1989. Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. Development 107: 1-22.

Foe, V. E. and B. M. Alberts. 1983. Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in Drosophila embryogenesis. J. Cell Sci. 61: 31-70.

Foe, V. E., G. M. Odell and B. A. Edgar. 1993. Mitosis and morphogenesis in the Drosophila embryo: Point and counterpoint. In B. M. Bate and A. Martinez-Arias (eds.), The Development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Forlani, S., D. Ferrandon, O. Saget and E. Mohier. 1993. A regulatory function for K10 in the establishment of dorsoventral polarity in the Drosophila egg and embryo. Mech. Dev. 41: 109-120.

François, V., M. Solloway, J. W. O'Neill, J. Emery and E. Bier. 1994. Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. Genes Dev. 8: 2602-2616.

Frigerio, G., M. Burri, D. Bopp, S. Baumgartner and M. Noll. 1986. Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. Cell 47: 735-746.

Frischer, L. E., F. S. Hagen and R. L. Garber. 1986. An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. Cell 47: 1017-1023.

Fujioka, M., Y. Emi-Sarker, G. L. Yusibova, T. Goto and J. B. Jaynes. 1999. Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. Development 126: 2527-2538.

Fullilove, S. L. and A. G. Jacobson. 1971. Nuclear elongation and cytokinesis in Drosophila montana. Dev. Biol. 26: 560-578.

Furlong. E. E. M., E. C. Andersen, B. Null, K. P. White and M. P. Scott.2001. Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development. Science 293: 1629-1633.

Furriols, M., A. Casali and J. Casanova. 1998. Dissecting the mechanism of torso receptor activation. Mech. Dev. 70: 111-118.

Gabay, L., R. Seger and B. Z. Shilo. 1997. MAP kinase in situ activation atlas during Drosophila embryogenesis. Development 124: 3535-3541.

Galindo, R. L., D. N. Edwards, S. K. H. Gillespie and S. A. Wasserman. 1995. Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in Drosophila embryos. Development 121: 2209-2218.

Gaul, U. and H. Jackle. 1990. Role of gap genes in early Drosophila development. Annu. Rev. Genet. 27: 239-275.

Gavis, E. R. and R. Lehmann. 1992. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. Cell 71: 301-313.

González-Crespo, S. and M. Levine. 1994. Related target enhancers for dorsal and NF-κB signalling pathways. Science 264: 255-258.

González-Reyes, A. and G. Morata. 1990. The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. Cell 61: 515-522.

Gonzáles-Reyes, A., H. Elliott and D. St. Johnson. 1995. Polarization of both major body axes in Drosophila bygurken-torpedo signalling. Nature 375: 654-658.

Grossniklaus, U., K. M. Cadigan and W. J. Gehring. 1994. Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the Drosophila head. Development 120: 3155-3171.

Hafen, E., M. Levine and W. J. Gehring. 1984. Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in Drosophila. Nature 307: 287-289.

Hanes, S. D. and R. Brent. 1989. DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. Cell 57: 1275-1283.

Hanes, S. D. and R. Brent.1991. A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. Science 251: 426-430.

Harding, K. and M. Levine. 1988. Gap genes define the limits of Antennapedia and Bithorax gene expression during early development in Drosophila. EMBO J. 7: 205-214.

Harding, K. and M. Levine. 1989. Drosophila: The zygotic contribution. In D. M. Glover and B. D. Hames (eds.), Genes and Embryos. IRL, New York, pp. 38-90.

Harding, K., C. Wedeen, W. McGinnis and M. Levine. 1985. Spatially regulated expression of homeotic genes in Drosophila. Science 229-1236-1242.

Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson. 1988. The toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarit appears to encode a transmembrane protein Cell 52: 269-279.

Hashimoto, C., S. Gerttula and K. V. Anderson. 1991. Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial Drosophila embryo: Importance of transmembrane signalling for dorsal-ventral pattern formation. Development 11: 1021-1028.

Driever, W. and C. Nüsslein-Volhard. 1988b. A gradient of Bicoid protein in Drosophila embryos. Cell 54: 83-93.

Driever, W. and C. Nüsslein-Volhard. 1989. The Bicoid protein is a positive regulator of hunch-back transcription in the early Drosophila embryo. Nature 337: 138-143.

Driever, W., G. Thoma and C. Nisslein-Volhard. 1989. Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the Drosophila embryo by the affinity of binding sites for the Bicoid morphogen. Nature 340: 363-367.

Driever, W., V. Siegel and C. Nusslein-Volhard. 1990. Autonomous determination of anterior structures in the early Drosophila embryo by the Bicoid morphogen. Development 109: 811-820.

Edgar, B. A. and P. H. O'Farrell. 1989. Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. Cen 57: 177-187.

Edgar, B. A., C. P. Kiehle and G. Schubiger. 1986a. Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early Drosophila development. Cell Edgar, B. A., M. P. Weir, G. Schubiger and T. Kornberg. 1986b. Repression and turnover pattern offushi tarazu RNA in the early Drosophila embryo. Cell 47: 747-754.

Ferguson, E. L and K. V. Anderson. 1991. Dorsal-ventral pattern formation in the Drosophila embryo: The role of zygotically active genes. Curr. Top. Dev. Biol. 25: 17-43.

Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof and C. Nusslein-Volhard. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-Stufen ribonucleoprotein particles.EMBO J. 16: 1751-1758.

Finkelstein, R. and N. Perrimon.1990. The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies Drosophila head development. Nature 346: 485-488.

Foe, V. E. 1989. Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. Development 107: 1-22.

Foe, V. E. and B. M. Alberts. 1983. Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in Drosophila embryogenesis. J. Cell Sci. 61: 31-70.

Foe, V. E., G. M. Odell and B. A. Edgar. 1993. Mitosis and morphogenesis in the Drosophila embryo: Point and counterpoint. In B. M. Bate and A. Martinez-Arias (eds.), The Development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Forlani, S., D. Ferrandon, O. Saget and E. Mohier. 1993. A regulatory function for K10 in the establishment of dorsoventral polarity in the Drosophila egg and embryo. Mech. Dev. 41: 109-120.

François, V., M. Solloway, J. W. O'Neill, J. Emery and E. Bier. 1994. Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. Genes Dev. 8: 2602-2616.

Frigerio, G., M. Burri, D. Bopp, S. Baumgartner and M. Noll. 1986. Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. Cell 47: 735-746.

Frischer, L. E., F. S. Hagen and R. L. Garber. 1986. An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. Cell 47: 1017-1023.

Fujioka, M., Y. Emi-Sarker, G. L. Yusibova, T. Goto and J. B. Jaynes. 1999. Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. Development 126: 2527-2538.

Fullilove, S. L. and A. G. Jacobson. 1971. Nuclear elongation and cytokinesis in Drosophila montana. Dev. Biol. 26: 560-578.

Furlong. E. E. M., E. C. Andersen, B. Null, K. P. White and M. P. Scott.2001. Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development. Science 293: 1629-1633.

Furriols, M., A. Casali and J. Casanova. 1998. Dissecting the mechanism of torso receptor activation. Mech. Dev. 70: 111-118.

Gabay, L., R. Seger and B. Z. Shilo. 1997. MAP kinase in situ activation atlas during Drosophila embryogenesis. Development 124: 3535-3541.

Galindo, R. L., D. N. Edwards, S. K. H. Gillespie and S. A. Wasserman. 1995. Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in Drosophila embryos. Development 121: 2209-2218.

Gaul, U. and H. Jackle. 1990. Role of gap genes in early Drosophila development. Annu. Rev. Genet. 27: 239-275.

Gavis, E. R. and R. Lehmann. 1992. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. Cell 71: 301-313.

González-Crespo, S. and M. Levine. 1994. Related target enhancers for dorsal and NF-κB signalling pathways. Science 264: 255-258.

González-Reyes, A. and G. Morata. 1990. The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. Cell 61: 515-522.

Gonzáles-Reyes, A., H. Elliott and D. St. Johnson. 1995. Polarization of both major body axes in Drosophila bygurken-torpedo signalling. Nature 375: 654-658.

Grossniklaus, U., K. M. Cadigan and W. J. Gehring. 1994. Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the Drosophila head. Development 120: 3155-3171.

Hafen, E., M. Levine and W. J. Gehring. 1984. Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in Drosophila. Nature 307: 287-289.

Hanes, S. D. and R. Brent. 1989. DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. Cell 57: 1275-1283.

Hanes, S. D. and R. Brent.1991. A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. Science 251: 426-430.

Harding, K. and M. Levine. 1988. Gap genes define the limits of Antennapedia and Bithorax gene expression during early development in Drosophila. EMBO J. 7: 205-214.

Harding, K. and M. Levine. 1989. Drosophila: The zygotic contribution. In D. M. Glover and B. D. Hames (eds.), Genes and Embryos. IRL, New York, pp. 38-90.

Harding, K., C. Wedeen, W. McGinnis and M. Levine. 1985. Spatially regulated expression of homeotic genes in Drosophila. Science 229-1236-1242.

Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson. 1988. The toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarit appears to encode a transmembrane protein Cell 52: 269-279.

Hashimoto, C., S. Gerttula and K. V. Anderson. 1991. Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial Drosophila embryo: Importance of transmembrane signalling for dorsal-ventral pattern formation. Development 11: 1021-1028.

Heemskerk, J. and S. DiNardo. 1994. Drosophila hedgehog acts as a morphogen in cellular patterning. Cell 76: 449-460.

Heemskerk, J., S. DiNardo, R. Kostriken and P. H. O'Farrell. 1991. Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. Nature 352: 404-410.

Hoch, M., N. Gerwin, H. Taubert and H. Jäckle. 1992. Competition for overlapping sites in the regulatory region of the Drosophila gene Krüppel. Science 256: 94-97.

Hong, C. C. and C. Hashimoto. 1995. An unusual mosaic protein with a protease domain, encoded by the nudel gene, is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in Drosophila. Cell 82: 785-794.

Ingham, P. W. and A. Martinez-Arias. 1986. The correct activation of Antennapedia and bithorax complex genes requires the fushi tarazu gene. Nature 324: 592-597.

Ingham, P. W. and R. Whittle. 1980. Trithorax: A new homeotic mutation of Drosophila causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments. I. Putative role during embryogenesis. Mol. Gen. Genet. ' 179: 607-614.

Ingham, P. W., A. M. Taylor and Y. Nakano. 1991. Role of Drosophila patched gene in positional signalling. Nature 353: 184-187.

Irish, V. F. and W. M. Gelbart. 1987. The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo. Genes Dev. 1: 868-879.

Jäckle, H., D. Tautz, R. Schuh, E. Seifert and R. Lehmann. 1986. Clioss-regulatory interactions among the gap genes of Drosophila. Nature 324: 668-670.

Jiang J. and M. Levine. 1993. Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold responses to the dorsal gradient morphogen. Cell 72: 741-752.

Jiang, J., D. Kosman, Y. T. Ip and M. Levine. 1991. The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early Drosophila embryos. Genes Dev. 5: 1881-1891.

Just, E. E. 1936. Quoted in R. G. Harrison, 1937. Embryology and its relations. Science 85:
369-374.

Kalthoff, K. 1969. Der Einfluss vershiedener Versuchparameter auf die Haufigkeit der Missbildung "Doppelabdomen" in UV-bestrahlten Eiern von Smittia sp. (Diptera, Chironomidae). Zool. Anz. Suppl. 33: 59-65.

Kalthoff, K. and K. Sander. 1968. Der Entwicklungsgang der Missbildung "Doppelabdomen" im partiell W-bestrahlten Ei von Smittia parthenogenetica (Diptera, Chirono-midae). Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 161: 129-146.

Kandler-Singer, I. and K. Kalthoff. 1976. Rnase sensitivity of an anterior morphogenetic determinant in an insect egg (Smittia sp. Chironomidae, Diptera). Proc. NatL. Acad. Sci. USA 73: 3739-3743.

Karr, T. L. and B. M. Alberts. 1986. Organization of the cytoskeleton in early Drosophila embryos. J. Cell. Biol. 102: 1494-1509.

Karr, T. L. and T. B. Kornberg. 1989. Fushi tarazu protein expression in the cellular blastoderm of Drosophila detected using a novel imaging technique. Development 105: 95-103.

Kaufman, T. C., M. A. Seeger and G. Olsen. 1990. Molecular and genetic organization of the Antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. Adv. Genet. 27: 309-362.

Kidd, S.1992. Characterization of the Drosophila cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. Cell 71: 623-635.

Klingler, M., M. Erdélyi, J. Szabad and C. Nusslein-Volhard.1988. Function of torso in determining the terminal anlagen of the Drosophila embryo. Nature 335: 275-277.

Knipple, D. C., E. Seifert, U. B. Rosenberg, A. Preiss and H. ackle. 1985. Spatial and temporal patterns of Kruppel gene expression in early Drosophila embryos. Nature 317: 404.

Kohler, R. 1994. Lords of the Fly. University of Chicago Press, Chicago.

Kosman, D., Y. T. Ip, M. Levine and K. Arora. 1991. Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo. Science 254: 118-122.

Kraut, R. and M. Levine. 1991. Mutually repressive interactions between the gap genes giant and Kruppel define middle body regions of the Drosophila embryo. Development 111: 611-621.

Lane, M. E. and D. Kalderon. 1994. RNA localization along the anteroposterior axis of the Drosophila oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. Genes Dev. 8: 2986-2995.

Lander, A. D., G. Nie and F. Y. Wan. 2002. Do morphogen gradients arise by diffusion? Dev. Cen 2: 785-796.

Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard. 1986. Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in Drosophila. Cell 47: 141-152.

Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard. 1991. The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo. Development 112: 679-691.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.-M. Reichhart and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene casette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86: 973-983.

LeMosy, E. K., Y. Q. Tan and C. Hashimoto. 2001. Activation of a protease cascade involved in patterning the Drosophila embryo. Proc Natl. Acad Sci. USA. 98: 5055-5060.

Leptin, M. 1991a. Mechanics and genetics of cell shape changes during Drosophila ventral furrow formation. In R. Keller et al. (eds.), Gastrulation: Movements, Patterns, and Molecules. Plenum, New York, pp. 199-212.

Leptin,M. 1991b. twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. Genes Dev. 5: 1568-1576.

Levine, M. S. and K. W. Harding. 1989. Drosophila: The zygotic contribution. In D. M. Glover and B. D. Hames (eds.), Genes and Embryos. IRL, New York, pp. 39-94.

Lewis, E. B. 1978. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature 276: 565-570.

Macdonald, P. M. and K. Kerr. 1998. Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. Mol. Cell. Biol. 18: 3788-3795.

Macdonald, P. M. and C. A. Smibert. 1996. Translational regulation of maternai mRNAs. Curr. Opin. Genet. Dev. 6: 403-407.

Macdonald, P. M. and G. Struhl. 1986. A molecular gradient in early Drosophila embryos and its role in specifying body pattern. Nature 324: 537-545.

Mann, R. S. and D. S. Hogness. 1990. Functional dissection of Ultrabithorax proteins in D. melanogaster. Cell 60: 597-610.

Martin, J. R., A. Railbaud and R. Ollo. 1994. Terminal elements in Drosophila embryo induced by torsolike protein. Nature 367: 741-745.

Martínez-Arias, A. and P. A. Lawrence. 1985. Parasegments and compartments in the Drosophila embryo. Nature 313: 639-642.

Mazumdar, A. and M. Mazumdar. 2002. How one becomes many: blastoderm cellularization in D. malanogaster. BioEssay 24: 1012-1022.

McKeon, J. and H. W. Brock. 1991. Interactions of the Polycoml group of genes vith homeotic loci of Drosophila. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 199: 387-396.

Mohler, J. and K. Vani. 1992. Molecular organization and embryonic expression of the hedge-hog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning in Drosophila. Development 115: 957-971.

Montell, D. J., H. Keshishian and A. C. Spradling. 1991. Laser ablation studies of the role of the Drosophila oocyte nudeus in pattern formation. Science 254: 290-293.

Müller, J. and M. Bienz. 1992. Sharp anterior boundary of homeotic gene expression conferred by the fushi tarazu protein. EMBO J. 11:3653-3661.

Müller, M., M. Affolter, W. Leupin, G. Otting, K. Wuthrich and W. J. Gehring.1988. Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antenapedia homeodomain. EMBO J. 7: 4299-4304.

Nambu, J. R., R. G. Franks, S. Hong and S. Crews. 1990. The single-minded gene of Drosophila is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. Cell 63: 63-75.

Neuman-Silberberg, F. S. and T. Schupbach. 1993. The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF-α-like protein. Cell 75: 165-174

Newport, J. W. and M. W. Kirschner. 1982. A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at mid-blastula stage. Cell 30: 687-696.

Niessing, D., W. Driever, F. Sprenger, H.Taubert, H. Jackle and R. Rivera-Pomar. 2000. Homeodomain position 54 specifies transcriptional versus translational control by Bicoid. Mol. Cell 5: 395-401.

Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature 287: 795-801.

Otting, G., Y. Q. Qian, M. Billeter, M. Muller, M. Affolter, W. J. Gehring and K. Wuthrich. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. EMBO J. 9: 3085-3092.

Pan, D., J.-D. Huang and A. J. Courey. 1991. Functional analysis of the Drosophila twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. Genes Dev. 5: 1892-1901.

Pankratz, M. J., E. Seifert, N. Gerwin, B. Billi, U. Nauber and H. Jackle. 1990. Gradients of Kruppel and knirps gene products direct pairrule gene stripe patterning in the posterior region of the Drosophila embryo. Cell 61: 309-317.

Panzer, S., D. Weigel and S. K. Beckendorf 1992. Organogenesis in Drosophila melanogaster: Embryonic salivary gland determination is controlled by fiomeotic and dorsoventral patterning genes. Development 114: 49-57.

Paroush, Z., S. M. Wainwright and D. Ish-Horowitz. 1997. Torso signaling mediates terminal patterning in Drosophila by antagonizing Groucho-mediated repression. Development 124: 3827-3834.

Peifer, M. and E. Wieschaus. 1990. Mutations in the Drosophila gene extradenticle affect the way specific homeodomain proteins regulate segment identity. Genes Dev. 4: 1209-1223.

Percival-Smith, A., M. Muller, M. Affolter and W. J. Gehring. 1990. The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains. EMBO J. 9: 3967-3974.

Peri, F., C. Bökel and S. Roth. 1999. Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during Drosophila oogenesis. Mech. Dev. 81: 75-88.

Pignoni, F., E. Steingrímsson and J. A. Lengyel. 1992. bicoid and the terminal system activate tailless expression in the early Drosophila embryo. Development 115: 239-251.

Plaza, S., F. Prince, J. Iaeger, U. Kloter, S. Flister, C. Benassayag, D. Cribbs and W. J.Gehring. 2001. Molecular basis for the inhibition of Drosophila eye development by Antennapedia. EMBO J. 20: 802-811.

Porter, J. A. and 10 others. 1996. Hedgehog patterning activity: Role of a lipophilic modification by the carboxy-terminal autoprocessing domain. Cell 86: 21-34.

Price, J. V., R. J. Clifford and T. Schupbach.1989. The maternal ventralizing gene torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the Drosophila EGF receptor homolog. Cell 56: 1085-1092.

Qureshi, S. T., P. Gros and D. Malo. 1999. Host resistance to infection. Trends Genet. 15: 291-294.

Raskolb, C. and E. Wieschaus. 1994. Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and homeotic selector proteins. EMBO J. 15:3561-3569.

Ray, R. P., and T. Schupbach. 1996. Intercellular signaling and the polarization of body axes during Drosophila oogenesis. Genes Dev. 10: 1711-1723.

Ray, R. P., K. Arora, C. Nusslein-Volhard and W. M. Gelbart. 1991. The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the Drosophila embryo. Development 113: 35-54.

Reach, M., R. L. Galindo, P. Towb, J. L. Allen, M. Karin and S. A. Wasserman. 1996. A gradient of Cactus protein degradation establishes dorsoventral polarity in the Drosophila embryo. Dev. Biol. 180: 353-364.

Reinitz, J. and D. H. Sharp. 1995. Mechanism of eve stripe formation. Mech. Dev. 49: 133-158.

Reinitz, J., E. Mjolsness and D. H. Sharp. 1995. Model for cooperative control of positional information in Drosophila by bicoid and maternal hunchback. J. Exp. Zool. 271: 47-56.

Riddihough, G. 1992. Homing in on the homeobox. Nature 357: 643-644.

Rivera-Pomar, R. and H. Jackle. 1996. From gradients to stripes in Drosophila embryogenesis: Filling in the gaps. Trends Genet. 12: 478-483.

Rivera-Pomar, R., X. Lu, N. Perrimon, H. Taubert and H. Jackle. 1995. Activation of posterior gap gene expression in the Drosophila blastoderm. Nature 376: 253-256.

Rivera-Pomar, R., D. Niessling, U. Schmidt-Ott, W. J. Gehring and H. Jackle. 1996. RNA binding and translational

suppression by bicoid. Nature 379: 746-749.

Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kasterlein and J. F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 588-593.

Roder, L., C. Vola and S. Kerridge. 1992. The role of teashirt in trunk segmental identity in Drosophila. Development 115: 1017-1033.

Roth, S., D. Stein and C. Nusslein-Volhard. 1989. A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the Drosophila embryo. Cell 59: 1189-1202.

Roth, S., F. S. Neuman-Silberberg, G. Barcelc and T. Schupbach. 1995. Cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila. Cell 81: 967-978.

Rushlow, C., J. Frasch, H. Doyle and M. Levine. 1987. Maternal regulation of a homeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in Drosophila. Nature 330: 583-586.

Rushlow, C. A., K. Han, J. L. Manley and M. Levine. 1989. The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in Drosophila. Cell 59: 1165-1177.

Sackerson, C. M. Fujioka and T. Goto. 1999. The even-skipped locus is contained in a 16-kb chromatin domain. Dev. Biol. 210: 39-52.

Sánchez-Herrero, E., r. Verños, R. Marco and G. Morata. 1985. Genetic organization of Drosophila bithorax complex. Nature 313: 108-113.

Sander, K. 1975. Pattern specification in the insect embryo. In Cell Patterning. CIBA Foundation Symposium, new series, 29. Associated Scientific Publishers, Amsterdam, NY, pp. 241-263.

Schejter, E. D. and E. Wieschaus. 1993. Bottle-neck acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the Drosophila embryo. Cell 75: 373-385.

Schier, A. F. and A. J. Gehring. 1992. Direct homeodomain-DNA interaction in the autoregulation of the fushi tarazu gene. Nature 356: 804-807.

Schneuwly, S., A. Kuroiwa and W. J. Gehring 1987. Molecular analysis of the dominant homeotic Antennapedia phenotype. EMBO J. 6: 201-206.

Schnorrer, F., K. Bohmann and C. Nisslein-Volhard. 2000. The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid BNA to the anterior pole of Drosophila oocytes. Nature Cell Biol. 2: 185-190.

Schulz, C. and D. Tautz. 1995. Zygotic caudal regulation by hunchback and its role in abdominal segment formation of the Drosophila embryo. Development 121: 1023-1028.

Schüpbach, T. 1987. Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in Drosophila melanogaster. Cell 49: 699-707.

Schüpbach, T. and E. Wieschaus. 1986. Maternal effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the Drosophila embryo. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 195: 302-317.

Schüpbach, T., R. J. Clifford, L. J. Manseau and J. V. Price. 1991. Dorsoventral signaling processes in Drosophila oogenesis. In J. Gerhart (ed.). Cell-GII Interactions in Early Development. Wiley-Liss, New York, pp. 163-174.

Schwalm, F. 1997. The insects. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 259-278.

Sen, J., J. S. Goltz, L. Stevens and D. Stein. 1998. Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. Cell 95: 471-481.

Shelton, C. A. and S. A. Wasserman. 1993. pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the Drosophila embryo. Cell 72: 515-525.

Siegfried, E., E. L. Wilder and N. Perrimon. 1994. Components of wingless signalling in Drosophila. Nature 367: 76-80.

Simmonds, A. J., G. dosSantos, I. Livne-Bar and H. M. Krause. 2001. Apical localization of wingless transcripts is required for wingless signaling. Cell 105: 197-207.

Simon, J., A. Chiang and W. Bender. 1992. Ten different Polycomb genes are required for spatial control of the abdA and AbdB homeotic products. Development 114: 493-505.

Simpson-Brose, M., J. Treisman and C. Desplan. 1994. Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in Drosophila. Cell 78: 855-865.

Skeath, J. B. and S. B. Carroll. 1992. Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the Drosophila embryo. Development 114: 939-946.

Skeath, J. B., G. Panganiban, J. Selegue and S. B. Carroll. 1993. Gene regulation in two dimensions: The proneural achaete and scute genes are controlled by combinations of axis-patterning genes through a common intergenic control region. Genes Dev. 6: 2606-2619.

Slack, J. M. W. 1983. From Egg to Embryo: Determinative Events in Early Development. Cambridge University Press, Cambridge.

Smail, S., R. Kraut, T. Hoey, R. Warrior and M. Levine. 1991. Transcriptional regulation of a pair-rule stripe in Drosophila. Genes Dev. 5: 827-839.

SmaU, S., A. Blair and M. Levine. 1992. Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo. EMBO J. 11: 4047-4057.

Small, S., A. Blair and M. Levine. 1996. Regulation of two pair-rule stripes by a single enhancer in the Drosophila embryo. Dev. Biol. 175: 314-324.

Smibert, C. A., J- E. Wilson, K. Kerr and P. M. Macdonald. 1996. Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. Genes Dev. 10: 2600-2609.

Stanojevic, D., T. Hoey and M. Levine. 1989. Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by hunchback and Kruppel in Drosophila. Nature 341: 331-335.

Stanojevic, D., S. Small and M. Levine. 1991. Regulators of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the Drosophila embryo. Science 254: 1385-1387.

Stephanson, E. C., Y.-C. Chao and J. D. Frackenthal. 1988. Molecular analysis of the swallow gene of Drosophila melanogaster. Genes Dev. 2: 1655-1665.

Srinivasan, S., K. E. Rashka and E. Bier. 2002. Creation of a Sog morphogen gradient in the Drosophila embryo. Dev. Cell 2: 91-101.

Stevens, L. M., H. G. Frohnhofer, M. Klingler and C. Nusslein-Valhard. 1990. Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the Drosophila embryo. Nature 346: 660-662.

Steward, R. 1989. Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. Cell 59: 1179-1188.

Steward, R. and S. Govind. 1993. Dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 556-561.

St. Johnston, D. and C. Nusslein-Volhard. 1992. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. Cell 68: 201-219.

Struhl, G. 1981. A homeotic mutation transforming leg to antenna in Drosophila. Nature 292: 635-638.

Struhl, G., K. Struhl and P. M. Macdonald. 1989. The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. Cell 57: 1259-1273.

Struhl, G., P. Johnson and P. Lawrence. 1992. Control of a Drosophila body pattern by the Hunchback morphogen gradient. Cell 69: 237-249.

Sullivan, W., P. Fogarty and W. E. Theurkauf 1993. Mutations affecting the cytoskeletal organization of syncytial Drosophila embryos. Development 118: 1245-1254.

Tautz, D. 1988. Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centers. Nature 332: 281-284.

Thisse, B., C. Stoetzel, C. Gorostiza-Thisse and F. Perrin-Schmidt. 1988. Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos. EMBO J. 7: 2175-2183.

Thisse, C., F. Perrin-Schmidt, C. Stoetzel and B. Thisse. 1991. Sequence-specific transactivation of the Drosophila twist gene by the dorsal gene product. Cell 65: 1191-1201.

Turner, F. R. and A. P. Mahowald. 1977. Scanning electron microscopy of Drosophila melanogaster embryogenesis. Dev. Biol. 57: 403-416.

Tyler, M. S. and J. W. Schetzer. 1996. The Lives of a Fly. (Videocassette.) ASAP Media Services, Orono, ME, and Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Vachon, G., B. Cohen, C. Pfeifle, M. E. McGuffin, J. Botas and S. M. Cohen. 1992. Homeotic genes of the bithorax complex repress limb development in the abdomen of the Drosophila embryo through the target gene Distal-less. Cell. 71: 437-450.

Valentine, S. A., G. Chen, T. Shandala, J Fernandez, S. Mische, R. Saint and A. J. Courney. 1998. Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer. Mol. Cell. Biol. 18: 6584-6594.

van Dyke, M. A. and C. Murre. 1994. Extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. Cell 78: 617-624.

Van Eeden, F. and D. St. Johnston. 1999. The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during Drosophila oogenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 396-404.

Wakimoto, B. T., F. R. Turner and T. C. Kaufinan. 1984. Defects in embryogenesis in mutants associated with the Antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 102: 147-172.

Wang, C. and R. Lehman. 1991. Nanos is the localized posterior determinate in Drosophila. Cell 66: 637-647.

Weatherbee, S. D., G. Halder, J. Kim, A. Hudson and S. Carroll. 1998. Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the Drosophila haltere. Genes Dev. 12: 1474-1482.

Whalen, A. M. and R. Steward. 1993. Dissociation of the dorsal-cactus complex and phosphorylation of the dorsal protein correlate with the nuclear localization of dorsal. J. Cell. Biol. 123: 523-534.

Wharton, R. P. and G. Struhl. 1991. RNA regulatory elements mediate control of Drosophila body pattern by the posterior morphogen Nanos. Cell 67: 955-967.

Wilkie, G. S. and I. Davis. 2001. Drosophila wingless andpair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. Cell 105: 209-219.

Wolff, C., R. Schroder, C. Schulz, D. Tautz and M. Klingler. 1998. Regulation of the Tribolium homologues of caudal and hunchback in Drosophila: Evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. Development 125: 3645-3654.

Wreden, C., A. C. Verrotti, J. A. Schisa, M. E. Lieberfarb and S. Strickland. 1997. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. Development 124: 3015-3023.

Wu, L. H. and J. A. Lengyel. 1998. Role of caudal in hindgut specification and gastrulation suggests homology between Drosophila amnioproctodeal invagination and vertebrate blastopore. Development 125: 2433-2442.

Wu, X., V. Vasisht, D. Kosman, J. Reinitz and S. Small. 2001. Thoracic patterning by the Drosophila gap gene hunchback. Dev. Biol. 237: 79-92.

Zhou, B., A. Bagri and S. K. Beckendorf. 2001. Salivary gland determination in Drosophila: A salivary-specific, forkhead enhancer integrates spatial pattern and allows forkhead autoregulation. Dev. Biol. 237: 54-67.

Capítulo 10 Desarrollo temprano y formación del eje en los anfibios

El estudio del papel de los genes en la ontogenia es un campo para la fisiología del desarrollo. Sin que el genetista sea excluido de la resolución de este problema –él llegará a ser un embriólogo experimental genético. Después de un viaje largo que lo llevó a veces a perder de vista a sus compañeros biólogos, él vuelve a casa otra vez con algunos conceptos e instrumentos nuevos.
CURT STERN (1936)

Estamos de pie y andando con partes de nuestro cuerpo que podrían haber sido utilizadas para pensar, habiendo sido desarrolladas en otras partes del embrión.
HANS SPEMANN (1943)

Las teorías vienen y las teorías van. La rana continúa.
JEAN ROSTAND (1960)

LOS EMBRIONES DE LOS ANFIBIOS FUERON LOS ORGANISMOS de elección para la embriología experimental. Con sus grandes células y su rápido desarrollo, los embriones de salamandra y de rana eran excelentemente apropiados para experimentos de trasplante. Sin embargo, estos embriones no fueron favorecidos durante los primeros días de la genética del desarrollo, debido a que ranas y salamandras experimentan un período largo de crecimiento antes de que lleguen a ser fértiles, sus cromosomas son hallados con frecuencia en varias copias y se excluye así la mutagénesis fácil.* Sin embargo, nuevas técnicas moleculares como la hibridación in situ, los oligonucleótidos antisentido y las proteínas dominantes negativas han permitido a los investigadores regresar a los estudios de embriones de anfibio e integrar el análisis molecular del desarrollo con hallazgos experimentales tempranos. Los resultados han sido espectaculares y estamos disfrutando de nuevos panoramas de cómo se establecen los patrones y de cómo son estructurados los cuerpos de los vertebrados.

DESARROLLO TEMPRANO EN LOS ANFIBIOS

Segmentación en los anfibios

La segmentación en la mayoría de los embriones de salamandra es radialmente simétrica y holoblástica, igual que la segmentación de los equinodermos. Los huevos (cigotos) de anfibio,† sin embargo, contienen mucho más vitelo. Este vitelo, que está concentrado en el hemisferio vegetal, es un impedimento para la segmentación. Por lo tanto, la primera división comienza en el polo animal y se extiende lentamente descendiendo hacia la región vegetal (fig. 10-1; véanse además figs. 2-2D y 8-4). En la salamandra axolotl, el surco de segmentación se extiende a través del hemisferio animal a un ritmo cercano a 1 mm por minuto. El surco de segmentación corta la medialuna gris y luego se retrasa hasta unos simples 0,02-0,03 mm por minuto cuando éste se aproxima al polo vegetal (Hara 1977).

* En la década de 1960, *Xenopus laevis* reemplazó a las ranas *Rana* y a las salamandras debido a que éste podía ser inducido a aparearse durante el año. Lamentablemente, *Xenopus laevis* tiene cuatro copias de cada cromosoma en lugar de las dos más frecuentes y le lleva 1-2 años alcanzar la madurez sexual. Estos atributos hacen dificultosos los estudios genéticos. Recientemente otra especie de *Xenopus*, *X. tropicalis*, ha comenzado a utilizarse en el laboratorio. Tiene todas las ventajas de *X. laevis*, más el hecho de ser diploide y de alcanzar la madurez sexual en tan solo 6 meses (Hirsch y col. 2002).

† *Nota del traductor:* como para el caso de otros organismos ya explicados, el que da comienzo a la etapa de segmentación es el cigoto para luego continuar ésta en las blastómeras a las que da origen. Aun cuando se utiliza la denominación de huevo se debe tener presente el estadio de desarrollo en el que se encuentra. Suele hablarse de huevos de anfibios incluso en estados avanzados de la etapa de segmentación en la cual dentro de la estructura del huevo hay que considerar la presencia de numerosas blastómeras. Huevo puede referirse al cigoto inicialmente o también al conjunto de células contenidas dentro de éste que están atravesando el período de segmentación.

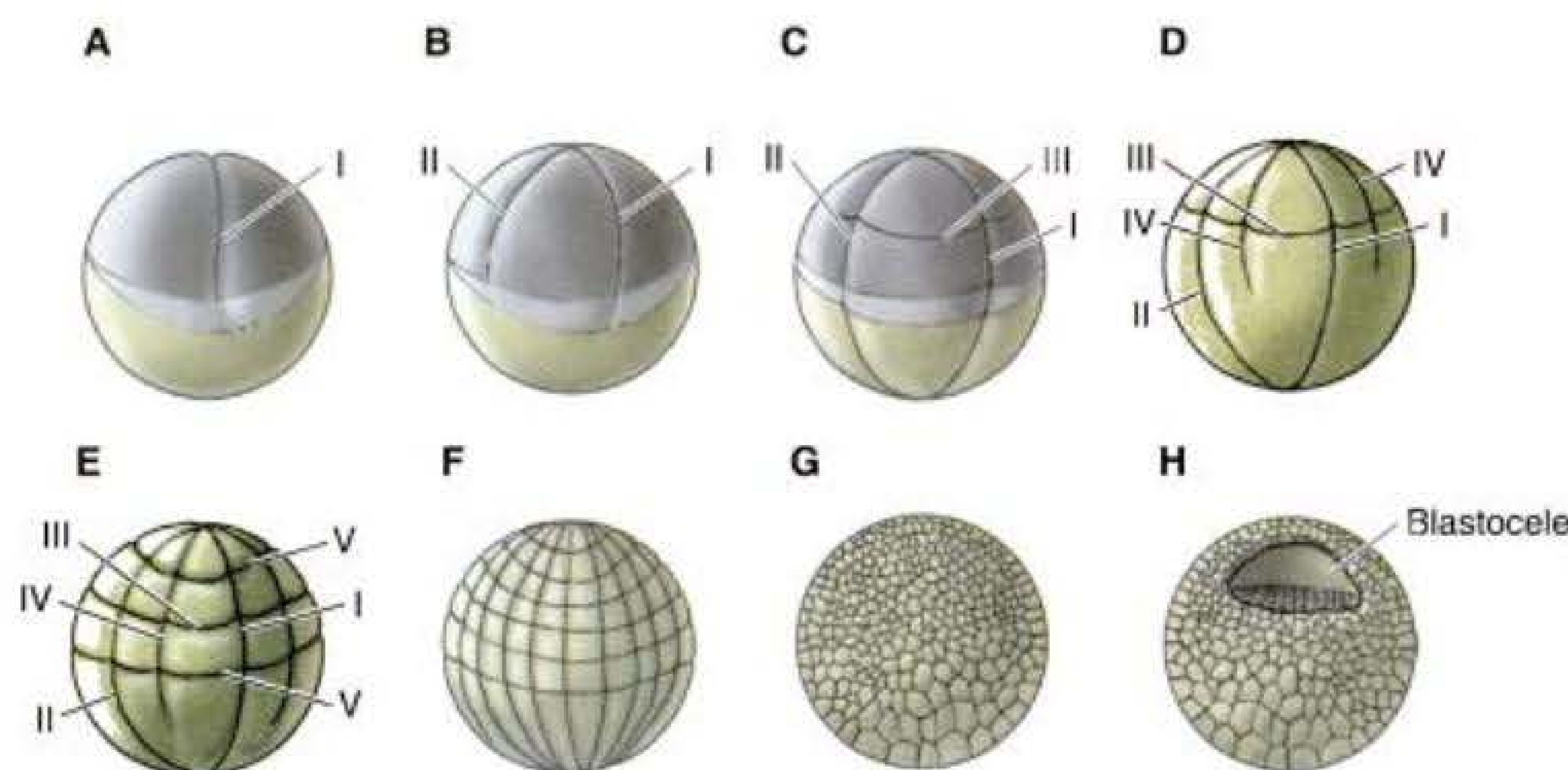


Fig. 10-1. Segmentación de un huevo (cigoto) de rana. Los surcos de segmentación, designados por números romanos, están numerados en orden de aparición. **A, B.** Debido a que el vitelo vegetal dificulta la segmentación, la segunda división comienza en la región animal del huevo antes que la primera división haya dividido al citoplasma vegetal. **C.** La tercera división es desplazada hacia el polo animal. **D–H.** El hemisferio vegetal finalmente contiene blastómeras más grandes y en menor número que las de la mitad animal. H representa una sección transversal a través de un embrión en estadio de blástula media. (Según Carlson 1981.)

La figura 10-2A es una microfotografía electrónica de barrido que muestra la primera segmentación en un cigoto de rana. Se puede ver la diferencia en el surco entre los hemisferios animal y vegetal. La figura 10-2B muestra que mientras el primer surco de segmentación está todavía separando al citoplasma vitelínico del hemisferio vegetal, la segunda segmentación ya ha comenzado cerca del polo animal. Esta segmentación es en ángulo recto a la primera y es también meridional. La tercera segmentación, según lo esperado, es ecuatorial. Sin embargo, debido a que el vitelo está situado en el hemisferio vegetal, este surco de segmentación en los huevos de anfibio no se produce en realidad en el ecuador, sino que es desplazado hacia el polo animal (fig. 10-3A; Valles y col. 2002). El surco divide al embrión en cuatro blastómeras animales pequeñas (micrómeras) y cuatro blastómeras grandes (macrómeras) en la región vegetal. Esta segmentación holoblástica desigual establece dos regiones embrionarias principales: una región de micrómeras que se dividen rápidamente cerca del polo animal y un área de macrómeras vegetales que se dividen más lentamente (fig. 10-2C; véase además fig. 2-2E). A medida que progresa la segmentación, la región animal llega a ser ensamblada con numerosas células pequeñas, mientras que la región vegetal contiene solamente un número relativamente pequeño de macrómeras grandes cargadas de vitelo.

El ciclo celular de las blastómeras tempranas del *Xenopus* está regulado por los niveles citoplasmáticos del factor promotor de la mitosis (FPM). Como se discutió en el capítulo 8, el FPM tiene dos componentes, ciclina B y cinasa cdc2 dependiente de ciclina. En *Xenopus*, no hay fase G en el ciclo celular para las primeras 12 divisiones. Por lo tanto, no hay crecimiento entre las divisiones celulares. Los acontecimientos que permiten que el ciclo celular continúe (en el que los complejos de replicación del DNA comienzan a formarse sobre la cromatina) en realidad se producen mientras las células están en mitosis. El FPM activo estimula a las células a entrar en mitosis y las células entran en la fase S cuando el FPM es degradado. La ciclina B se incrementa linealmente después de su degradación al final de la mitosis (fig. 10-3B). La proteína cdc2, que está inactivada en la mitosis, llega a ser activada (por desfosforilación) durante la fase S. Sin embargo, este incremento en la actividad no es lineal. Hacia el final de la fase S, cdc2 experimenta un espectacular incremento en la actividad, creando bruscamente un gran incremento en la cantidad de FPM activo. Esto inicia los acontecimientos mitóticos y además prepara a la cromatina para la replicación en la fase S siguiente (Jares y Blow 2000; Iwabuchi y col. 2002).

Un embrión de anfibio que contiene 16 a 64 células es comúnmente denominado una **mórula** (plural: **mórulas**; latín, "mora," a cuya forma ésta se parece vagamente).



Fig. 10-2. Microfotografía electrónica de barrido de la segmentación de un huevo (cigoto) de rana. **A.** Primera segmentación. **B.** Segunda segmentación (4 células). **C.** Cuarta segmentación (16 células), que muestra la discrepancia de tamaño entre las células animales y vegetales después de la tercera división. (**A**, de Beams y Kessel 1976, fotografía cortesía de los autores; **B** y **C**, fotografías cortesía de L. Biedler.)

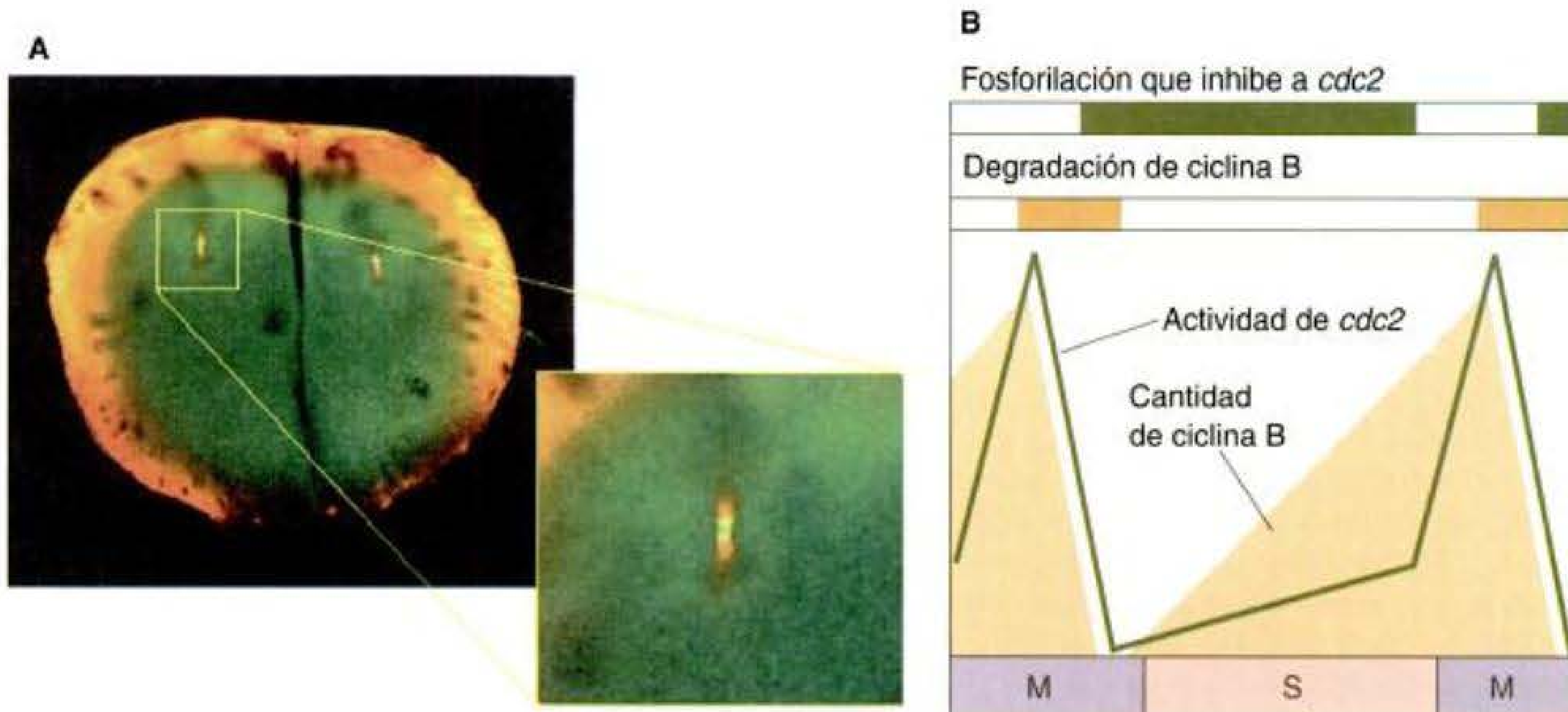


Fig. 10-3. Mitosis y replicación del DNA en *Xenopus*. **A.** Tercera segmentación de *Xenopus* que muestra el desplazamiento del huso mitótico hacia el polo animal. Los microtúbulos están en rojo; la cromatina, en verde y la superposición es amarilla). **B.** Regulación del ciclo celular mediante los niveles de actividad de cdc2 en las blastómeras tempranas de *Xenopus*. (**A**, según Valles y col. 2002; fotografía cortesía de J. M. Valles, Jr.; **B**, según Iwabuchi y col. 2002.)

En el estadio de 128 células, empieza a verse el blastocele y el embrión es considerado una blástula. En realidad, la formación del blastocele ha sido trazada hacia atrás hasta el primer surco de segmentación. Kalt (1971) demostró que en la rana de *Xenopus laevis*, el primer surco de segmentación se ensancha en el hemisferio animal para crear una pequeña cavidad intercelular que es cerrada desde el exterior por uniones intercelulares estrechas (uniones estrechas u oclusivas). Esta cavidad se expande durante las segmentaciones posteriores para llegar a ser el blastocele (fig. 10-4A).

El blastocele tiene dos funciones principales en los embriones de rana: 1) permite la migración celular durante la gastrulación y 2) evita que las células por debajo de éste interactúen prematuramente con las células que están por arriba. Cuando Nieuwkoop (1973) tomó células embrionarias de tritón* del techo del blastocele en el hemisferio animal (una región frecuentemente denominada "casquete animal"), y las colocó cerca de las células vegetales vitelínicas de la base del blastocele, estas células animales se diferenciaban a tejido mesodérmico en lugar de ectodermo. El tejido mesodérmico se forma normalmente a partir de las células animales que están adyacentes a los precursores endodérmicos vegetales, debido a que las células vegetales inducen a las células adyacentes a diferenciarse hacia tejido mesodérmico. Por lo tanto, el blastocele evita el contacto de las células vegetales destinadas a convertirse en endodermo con aquellas células destinadas a dar origen a la piel y al sistema nervioso.

Mientras estas células están dividiéndose, numerosas moléculas de adhesión celular mantiene juntas a las blastómeras. Una de las moléculas más importantes es la cadherina EP. El mRNA para esta proteína es suministrado en el citoplasma del ovocito. Si este mensajero es destruido (mediante la inyección en el ovocito de oligonucleótidos antisentido complementarios a su mRNA), no se producen las cadherinas EP y la adhesión entre las blastómeras se reduce drásticamente (Heasman y col. 1994a,b); esto da como resultado la obliteración del blastocele (fig. 10-4).

* *Nota del traductor:* tritón corresponde a la denominación en inglés de *newt* y el término salamandra a la denominación en inglés de *salamander*, pero es preciso aclarar que ambas denominaciones se refieren a los mismos organismos y que habitualmente suele utilizarse la denominación de salamandra.

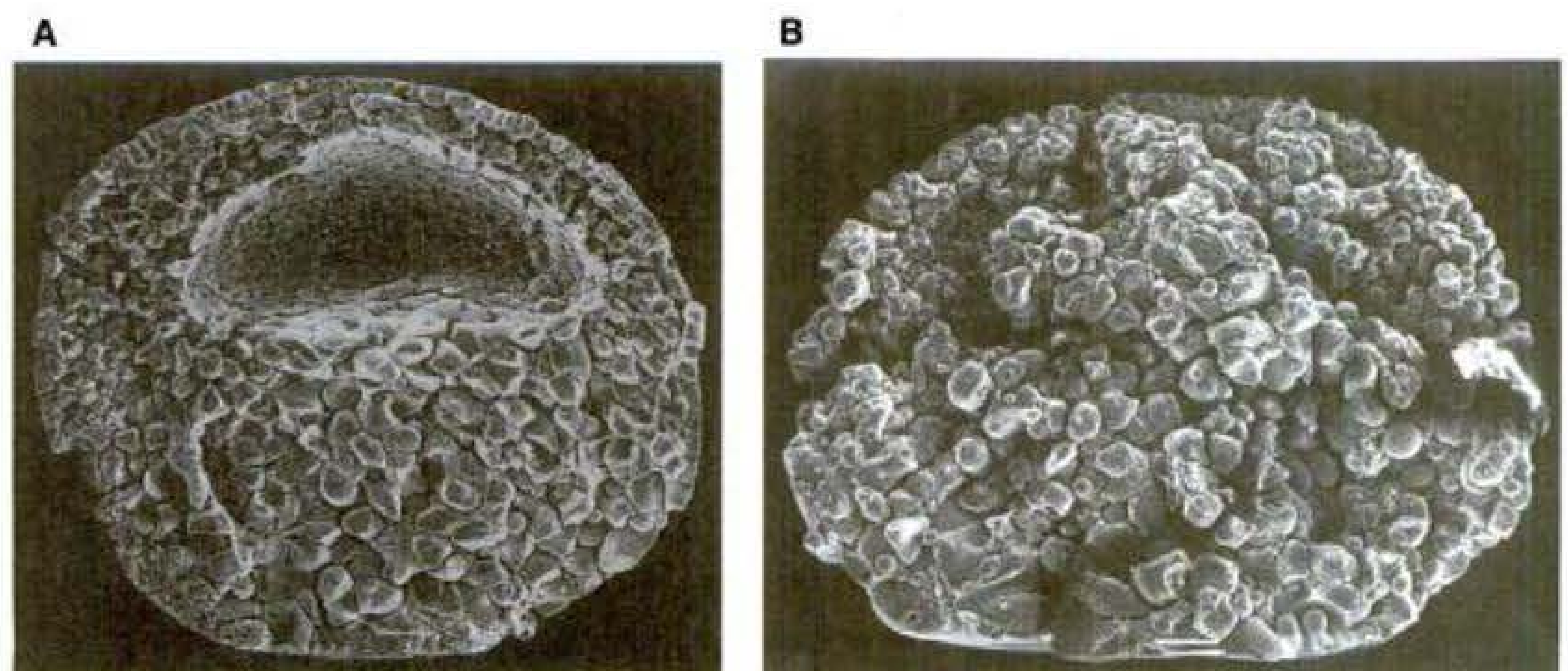


Fig. 10-4. La disminución del m-RNA de la cadherina-EP en los ovocitos de *Xenopus* da como resultado la pérdida de la adhesión entre las blastómeras y la obliteración del blastocele. **A.** Embrión con cadherina-EP disminuida. (De Heasman y col. 1994b; fotografías cortesía de J. Heasman.)

Gastrulación en los anfibios

El estudio de la gastrulación en anfibios es una de las áreas más antiguas y una de las más nuevas de la embriología experimental. Aun cuando la gastrulación de los anfibios ha sido estudiada extensamente en el siglo pasado, la mayor parte de las teorías acerca de los mecanismos de estos movimientos del desarrollo han sido revisadas en la década de 1990. Este estudio ha sido complicado por el hecho de que no hay un único modo de que los anfibios entren en este estadio. Diferentes especies utilizan distintos medios hacia el mismo objetivo (Smith y Malacinski 1983; Minsuk y Keller 1996). En años recientes, las investigaciones más intensivas se han centrado sobre la rana de *Xenopus laevis*, de modo tal que el texto se concentrará sobre este modo de gastrulación.

El mapa de destino de Xenopus

Las blástulas de anfibios se enfrentan a las mismas tareas que las blástulas de invertebrados que se describieron en los capítulos 8 y 9; concretamente, traer dentro del embrión las áreas destinadas a formar órganos endodérmicos, rodear al embrión con células capaces de formar ectodermo y colocar a las células mesodérmicas en las posiciones adecuadas entre ellos. Los movimientos para que esto sea llevado a cabo pueden visualizarse mediante la técnica de tinción con colorantes vitales (véase cap. 1). Los mapas de destino trazados por Løvtrup (1975; Landstrom y Løvtrup 1979) y por Keller (1975; 1976) han demostrado que las células de la blástula de *Xenopus* tienen diferentes destinos que dependen de si ellas están localizadas en las capas superficiales o en las profundas del embrión (fig. 10-5). En *Xenopus*, los precursores mesodérmicos existen en su mayoría en las capas profundas de las células, mientras que el ectodermo y el endodermo se originan desde la capa superficial sobre la superficie del embrión. La mayoría de los precursores de la notocorda y de otros tejidos mesodérmicos están localizados por debajo de la superficie en la región ecuatorial (marginal) del embrión. En los urodelos (salamandras como *Triturus* y *Ambystoma*) y en algunas otras ranas además de *Xenopus*, la mayoría de las células precursoras de la notocorda y del mesodermo están entre las células superficiales* (Purcell y Keller 1993; Shook y col. 2002).

Como se ha visto, los ovocitos sin fecundar tienen una polaridad a lo largo del eje animal-vegetal. Por lo tanto, las capas germinales pueden ser mapeadas sobre el ovocito aun antes de la fecundación. La superficie del hemisferio animal llegará a ser las células del ectodermo (piel y sistema nervioso), la superficie del hemisferio vegetal formará las células del intestino y de los órganos asociados (endodermo) y las células del mesodermo se formarán a partir del citoplasma interno alrededor del ecuador. Se piensa que este mapa de destino general es impuesto sobre el ovocito por el factor de transcripción **VegT** y el factor paracrino **Vg1** de la familia TGF-β. Los mRNA para estas proteínas están localizados en la corteza del hemisferio vegetal de los ovocitos de *Xenopus* y son distribuidos a las células vegetales durante la segmentación (véase fig. 5-34). Mediante el uso de oligonucleótidos antisentido, Zhang y col. (1998) fueron capaces de disminuir la proteína VegT materna en los embriones tempranos. Los embriones resultantes carecían del mapa de destino normal. El tercio animal del embrión produjo solo epidermis ventral, mientras que las células marginales (que normalmente producen mesodermo) generaron tejido epidérmico y neural. El tercio vegetal (que en general produce endodermo) produjo una mezcla de ectodermo y mesodermo (fig. 10-6). Joseph y Melton (1998) demostraron que embriones que carecían de Vg1 funcional también carecían de endodermo y de mesodermo dorsal. Por lo tanto, la asignación de células a las tres capas germinales depende de los determinantes citoplasmáticos prelocalizados establecidos en el ovocito.

Sin embargo, estos hallazgos no nos dicen nada acerca de qué partes del ovocito formarán el vientre y qué partes el dorso. Los ejes anteroposterior, dorsoventral e izquierda-derecha son especificados por acontecimientos desencadenados en la fecundación y realizados durante la gastrulación.

* En los urodelos, las células del mesodermo superficial se mueven hacia capas profundas mediante la formación de una línea primitiva similar a la de los embriones amniotas (véase el siguiente capítulo). Como en los embriones de pollo y de ratón, las células dejan la lámina epitelial para convertirse en células mesenquimáticas (Shook y col. 2002).

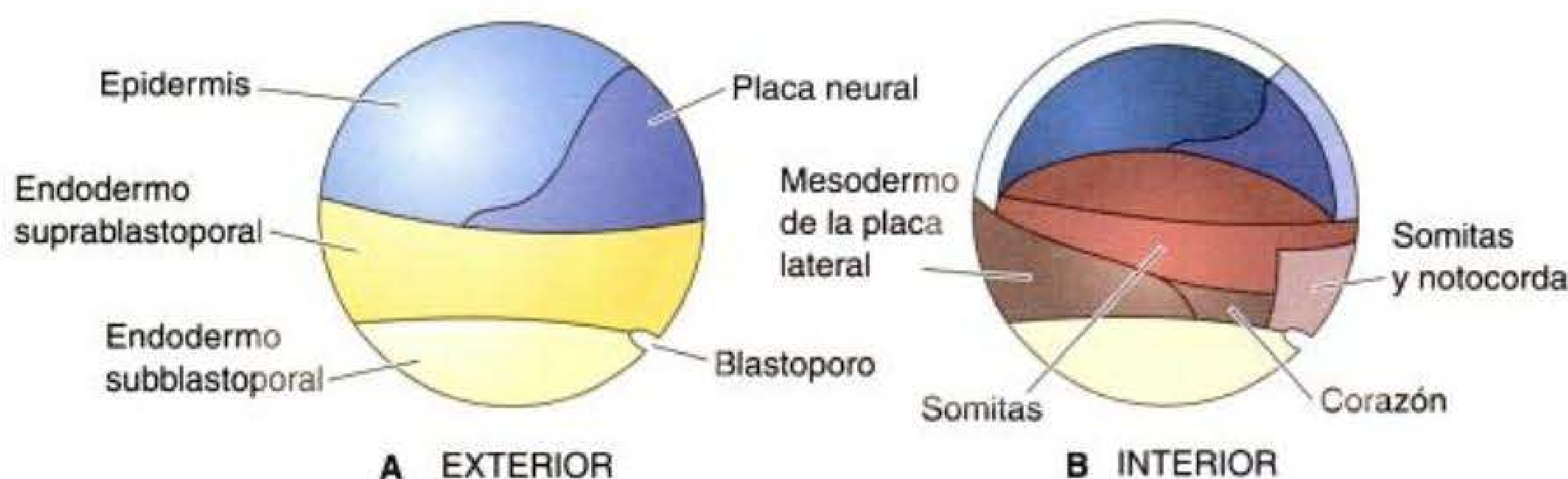


Fig. 10-5. Mapas de destino de la blástula de la rana *Xenopus laevis*. **A.** Exterior. **B.** Interior. La mayoría de los derivados mesodérmicos son formados a partir de las células interiores. La ubicación del mesodermo ventral se mantiene polémica (véase Kumano y Smith 2002; Lane y Sheets 2002). (Según Lane y Smith 1999; Newman y Krieg 1999.)

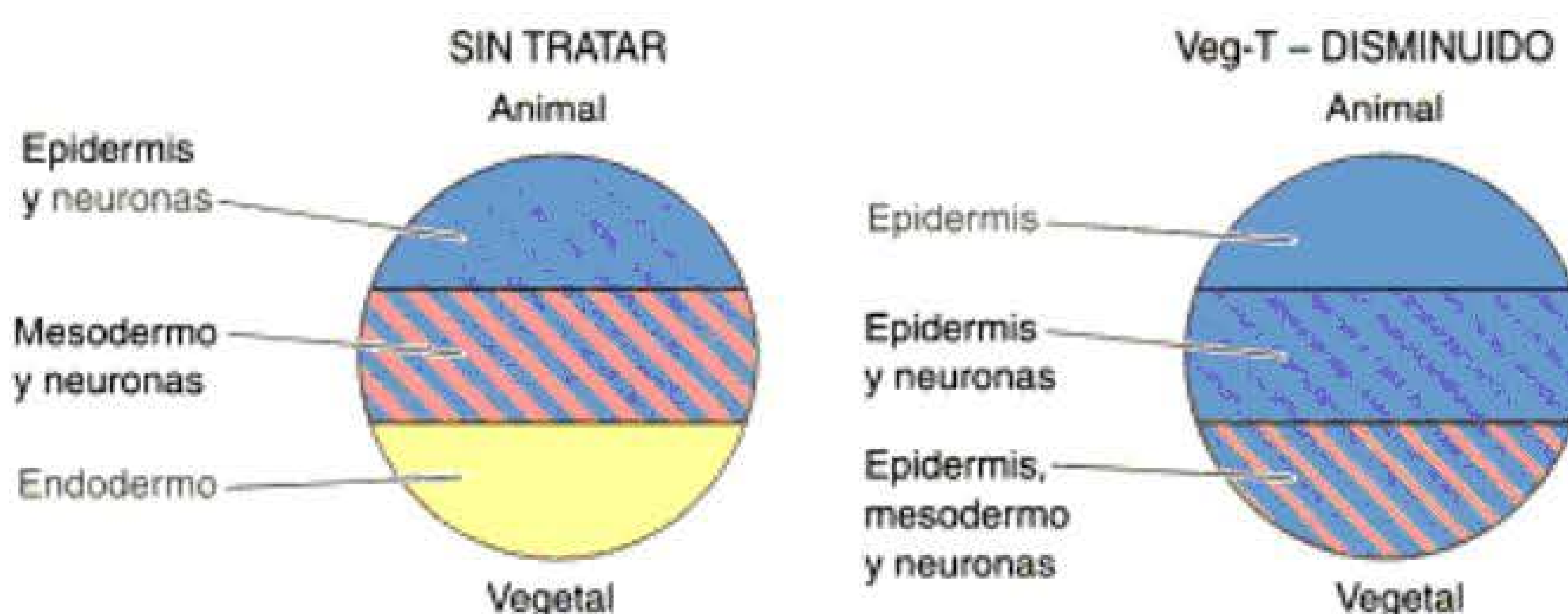


Fig. 10-6. Los destinos de tres regiones de la blástula de *Xenopus* son alterados mediante la disminución de VegT. En embriones normales, el tercio animal forma ectodermo epidérmico y neural, el tercio ecuatorial forma mesodermo y el tercio vegetal contiene la proteína VegT y forma el endodermo. En los embriones con VegT disminuida, el casquete animal forma solo epidermis ventral, mientras que el tercio ecuatorial produce ectodermo epidérmico y neural. El tercio vegetal de estos embriones produce ectodermo (epidérmico y neural) así como mesodermo. No se produce endodermo. (Según Zhang y col. 1998.)

VADE MECUM[2] **Desarrollo en los anfibios (Amphibian development).** Los acontecimientos de la segmentación y de la gastrulación son difíciles de imaginar sin modelos tridimensionales. Se pueden ver películas de tales modelos tridimensionales, así como secuencias de un embrión vivo de *Xenopus*, en los segmentos sobre el desarrollo de los anfibios. **[Hacer clic sobre Amphibian]**

Movimientos celulares durante la gastrulación

Antes de mirar en detalle el proceso de la gastrulación, primero se trazarán los patrones de movimientos generales de las capas germinales. La gastrulación en los embriones de rana se inicia sobre el futuro lado dorsal del embrión, justo por debajo del ecuador en la región de la medialuna gris (fig. 10-7). Aquí, las células se invaginan para formar una hendidura parecida al blastoporo. Estas células cambian su forma espectacularmente. El cuerpo principal de cada célula es desplazado hacia el interior del embrión mientras que la célula mantiene contacto con la superficie externa por medio de un cuello delgado (fig. 10-8). Estas **células de botella** revisten el arquenterón a medida que éste se forma. Por lo tanto, como en la gastrulación del erizo de mar, una invaginación de células inicia la formación del arquenterón. Sin embargo, a diferencia de la gastrulación en los erizos de mar, la gastrulación en la rana no comienza en la región más vegetal, sino en la **zona marginal**: la zona que rodea al ecuador de la blástula, donde se encuentran los hemisferios animal y vegetal. Aquí las células endodérmicas no son tan grandes o no tienen tanto vitelo como las blastómeras más vegetales.

La siguiente fase de la gastrulación involucra la involución (un tipo de movimiento) de las células de la zona marginal mientras que las células animales experimentan epibolia y convergen en el blastoporo (fig. 10-7C,D). Cuando las células marginales en migración alcanzan el **labio dorsal del blastoporo**, giran hacia el interior y viajan a lo largo de la superficie interna de las células externas del hemisferio animal. Por lo tanto, las células que constituyen el labio del blastoporo están cambiando constantemente. Las primeras células en componer el labio dorsal del blastoporo son las células de botella que se invaginan para formar el borde de avance del arquenterón. Estas células más tarde llegarán a ser las células faríngeas del intestino anterior. A medida que estas primeras células pasan hacia el interior del embrión, el labio dorsal del blastoporo llega a estar compuesto de células que mediante movimientos de involución hacia el embrión se convierten en la **placa precordal** (el precursor de la cabeza del mesodermo). Las siguientes células en involucionar hacia el embrión a través del labio dorsal del blastoporo son denominadas las células del **cordamesodermo**. Estas células formarán la **notocorda**, una "columna vertebral" de mesodermo transitorio que desempeña un papel importante en la inducción y el establecimiento del patrón del sistema nervioso.

A medida que las nuevas células ingresan en el embrión, el blastocele es desplazado hacia el lado opuesto del labio dorsal del blastoporo. Mientras tanto, el labio del blastoporo se expande lateral y ventralmente a medida que continúa el proceso de formación de células de botella e involución alrededor del blastoporo (fig. 10-9). El ensanchamiento de la "medialuna" del blastoporo desarrolla los labios laterales y por último un labio ventral sobre el cual pasan células precursoras mesodérmicas y endodérmicas adicionales. Con la formación del labio ventral, el blastoporo ha formado un anillo alrededor de las grandes células endodérmicas que se mantienen expuestas sobre la superficie vegetal. Este parche restante de endodermo es denominado **tapón vitelino**; éste, también, es finalmente internalizado (fig. 10-9). En este punto, todos los precursores endodérmicos han sido traídos hacia el interior del embrión, el ectodermo ha rodeado la superficie y el mesodermo ha sido llevado entre ellos.

La transición de la blástula media: preparación para la gastrulación

Ahora que se tiene una visión general de la gastrulación del anfibio, se pueden analizar más profundamente sus mecanismos. La primera condición para la gastrulación es la activación del genoma. En *Xenopus*, solo unos pocos genes parecen ser transcritos durante la segmentación temprana (Yang y col. 2002). En la mayor parte, los genes nucleares no son activados sino hasta el duodécimo ciclo celular tardío (Newport y Kirschner 1982a,b). En este momento, distintos genes comienzan a ser transcritos en diferentes células y las blastómeras adquieren la capacidad para llegar a ser móviles. Este cambio drástico es denominado **transición de blástula media (TBM)** (véanse caps. 8 y 9). Se piensa que algún factor en el huevo está siendo valorado por la nueva cromatina producida, debido a que el tiempo de su transición puede cam-

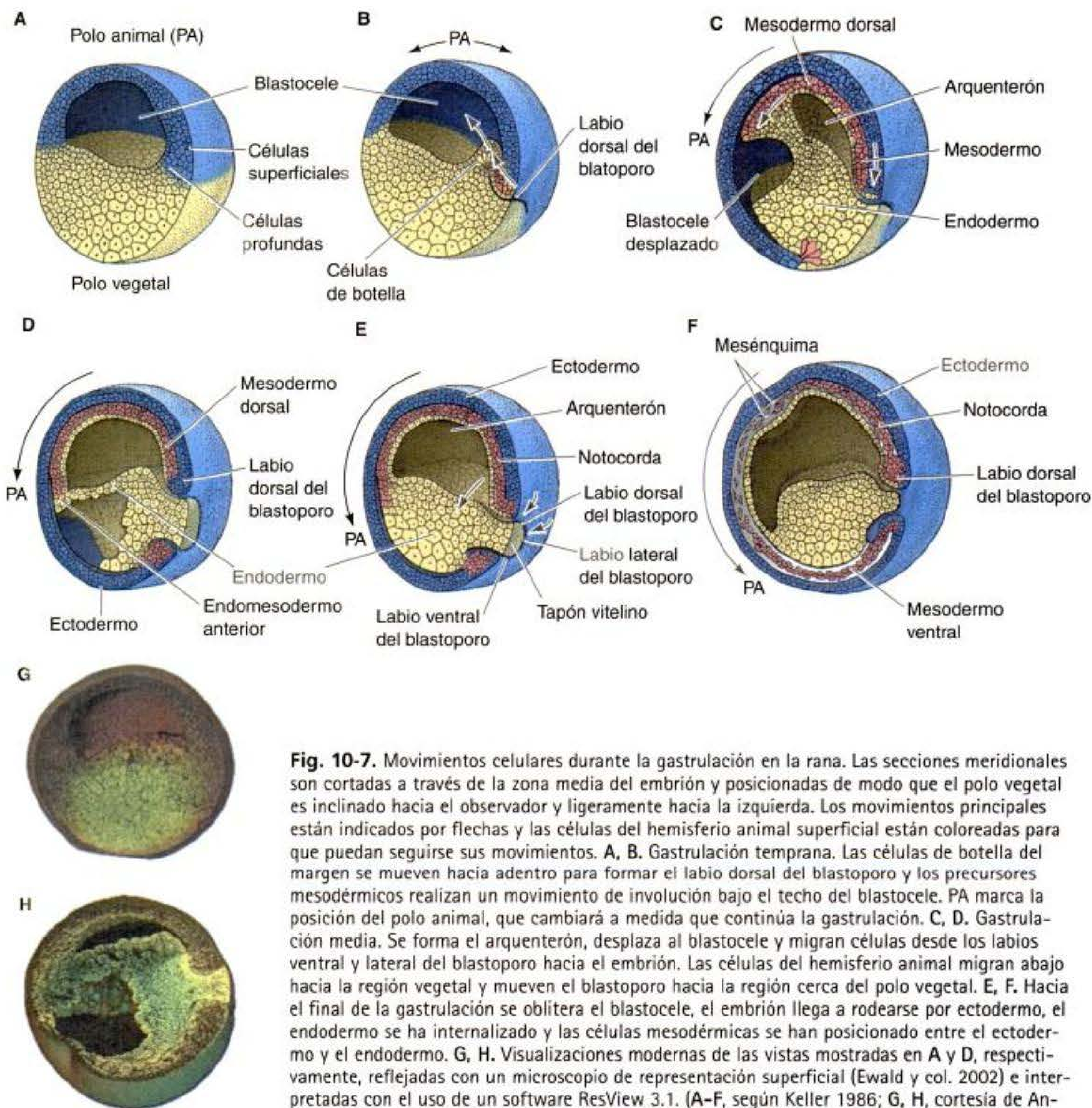


Fig. 10-7. Movimientos celulares durante la gastrulación en la rana. Las secciones meridionales son cortadas a través de la zona media del embrión y posicionadas de modo que el polo vegetal es inclinado hacia el observador y ligeramente hacia la izquierda. Los movimientos principales están indicados por flechas y las células del hemisferio animal superficial están coloreadas para que puedan seguirse sus movimientos. **A, B.** Gastrulación temprana. Las células de botella del margen se mueven hacia adentro para formar el labio dorsal del blastoporo y los precursores mesodérmicos realizan un movimiento de involución bajo el techo del blastocele. PA marca la posición del polo animal, que cambiará a medida que continúa la gastrulación. **C, D.** Gastrulación media. Se forma el arquenterón, desplaza al blastocele y migran células desde los labios ventral y lateral del blastoporo hacia el embrión. Las células del hemisferio animal migran abajo hacia la región vegetal y mueven el blastoporo hacia la región cerca del polo vegetal. **E, F.** Hacia el final de la gastrulación se oblitera el blastocele, el embrión llega a rodearse por ectodermo, el endodermo se ha internalizado y las células mesodérmicas se han posicionado entre el ectodermo y el endodermo. **G, H.** Visualizaciones modernas de las vistas mostradas en **A** y **D**, respectivamente, reflejadas con un microscopio de representación superficial (Ewald y col. 2002) e interpretadas con el uso de un software ResView 3.1. (**A–F**, según Keller 1986; **G, H**, cortesía de Andrew Ewald y Scott Fraser.)

biarse de manera experimental mediante la alteración en la célula de la proporción de la cromatina en relación al citoplasma (Newport y Kirschner 1982a,b). Por lo tanto, la segmentación comienza poco después de la fecundación y finaliza poco después en el estadio en el que el embrión consigue un nuevo equilibrio entre el núcleo y el citoplasma.

Uno de los acontecimientos que provoca la transición de la blástula media es la desmetilación de ciertos promotores. En *Xenopus* (a diferencia de los mamíferos), se observan altos niveles de DNA metilado en cromosomas que derivan tanto del padre como de la madre. Sin embargo, durante los estadios de blástula tardía, hay una pérdida de metilación sobre los promotores de los genes que son activados en la TBM. Esta desmetilación no se observa sobre los promotores que no son activados en la TBM, ni es vista en las regiones de codificación verdaderas de los genes de la TBM activados. Parece ser, entonces, que la desmetilación de ciertos promotores puede cumplir un papel fundamental en la regulación del ritmo de expresión de genes en la TBM (Stancheva y col. 2002).

Se piensa que una vez que la cromatina en los promotores ha sido remodelada, varios factores de transcripción (como la proteína VegT, mencionada antes) se unen a promotores y dan comienzo a una nueva transcripción. Por ejemplo, las células vegetales (probablemente bajo la dirección de la proteína VegT materna) llegan a ser el endodermo y comienzan a secretar los factores que hacen que las células por arriba de ellas se conviertan en mesodermo (Wylie y col. 1996; Agius y col. 2000).

Posicionamiento del blastoporo

El eje dorsoventral puede trazarse por el punto de entrada del espermatozoide. Los microtúbulos nucleados por el centríolo del espermatozoide dirigen los movimientos citoplasmáticos que le otorgan poder a las células vegetales opuestas al punto de entrada del espermatozoide para inducir el blastoporo en el mesodermo por encima de ellas. Esta región de células opuesta al punto de entrada del espermatozoide formará el blastoporo y llegará a ser la porción dorsal del cuerpo.

En el capítulo 7, se vio que el citoplasma interno de los ovocitos fecundados se mantiene orientado con respecto a la gravedad debido a su densa acumulación de vitelo, mientras que el citoplasma cortical activamente rota 30º en sentido animal ("hacia arriba"), hacia el punto de entrada del espermatozoide (véase fig. 7-33). En ese sentido, se adquiere un nuevo estado de simetría. Mientras que el ovocito sin fecundar era radialmente simétrico cerca del eje animal-vegetal, el ovocito fecundado tiene ahora un eje dorsoventral. Se ha hecho bilateralmente simétrico (tiene lados derecho e izquierdo). El citoplasma interno también se mueve. Estos movimientos citoplasmáticos activan al citoplasma opuesto al punto de entrada del espermatozoide, y le permiten iniciar la gastrulación. El lado donde ingresa el espermatozoide marca la futura superficie ventral (vientre) del embrión; el lado opuesto, donde es iniciada la gastrulación, marca el futuro lado dorsal (dorso) del embrión (Gerhart y col. 1981, 1986; Vincent y col. 1986). Si la rotación cortical es bloqueada, no hay desarrollo dorsal y el embrión muere como un "pieza ventral" en la que son formadas las tres capas germinales, pero están ausentes todas las estructuras dorsales (tubo neural, notocorda y somitas) (Vincent y Gerhart 1987).

Aunque el espermatozoide no es necesario para inducir estos movimientos en el citoplasma del huevo (es un estadio de cigoto en el momento de la fecundación), es importante en la determinación de la dirección de la rotación. Si un ovocito es activado artificialmente, la rotación todavía tiene lugar en el tiempo correcto. Sin embargo, la dirección de su movimiento es imprevisible. La tendencia direccional proporcionada por el punto de ingreso del espermatozoide puede anularse mediante el redireccionamiento mecánico de las relaciones espaciales entre los citoplasmas cortical e interno. Cuando un huevo de *Xenopus* es girado 90º, de modo tal que el punto de entrada del espermatozoide se encuentra hacia arriba, el citoplasma rota de modo tal que el embrión inicia la gastrulación sobre el mismo lado de ingreso del espermatozoide (Gerhart y col. 1981; Cooke 1986). Incluso se pueden producir dos sitios de inicio de la gastrulación

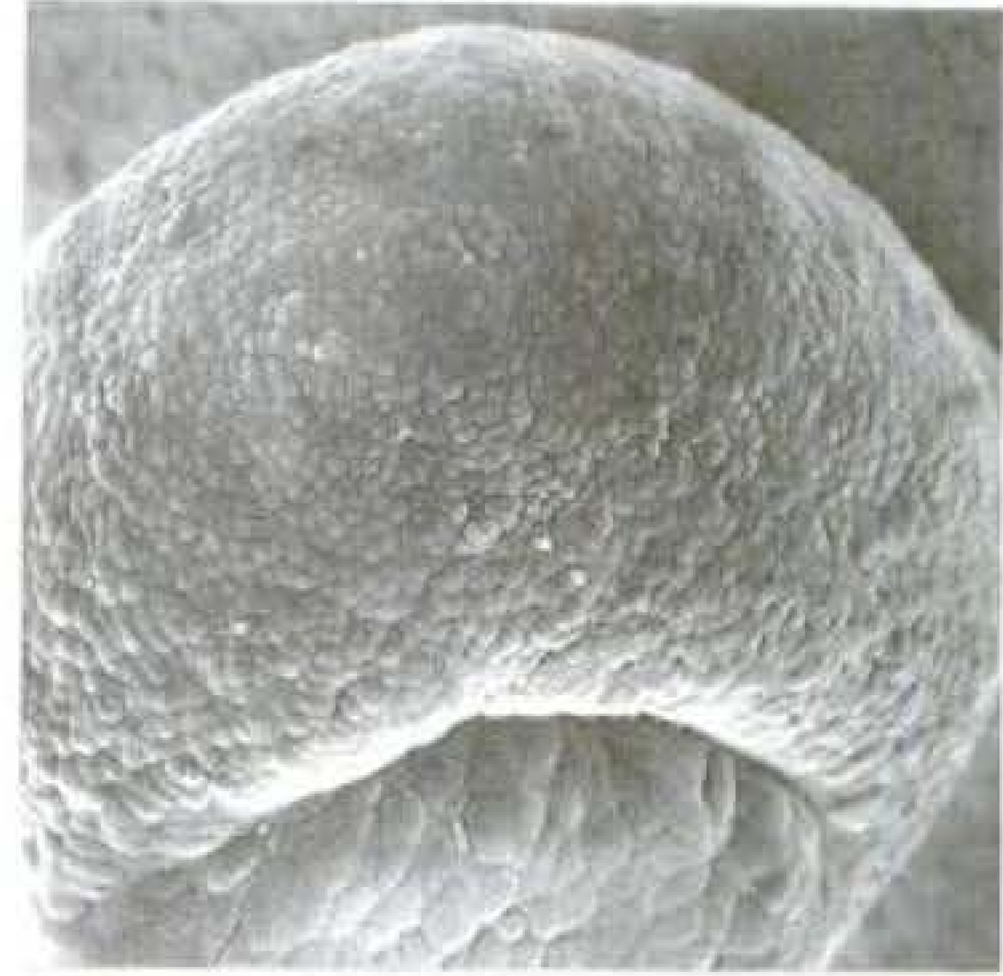


Fig. 10-8. Vista superficial de un labio dorsal del blastoporo temprano de *Xenopus*. La diferencia de tamaño entre las blastómeras vegetales y animales se observa con facilidad. (Microfotografía cortesía de C. Phillips.)

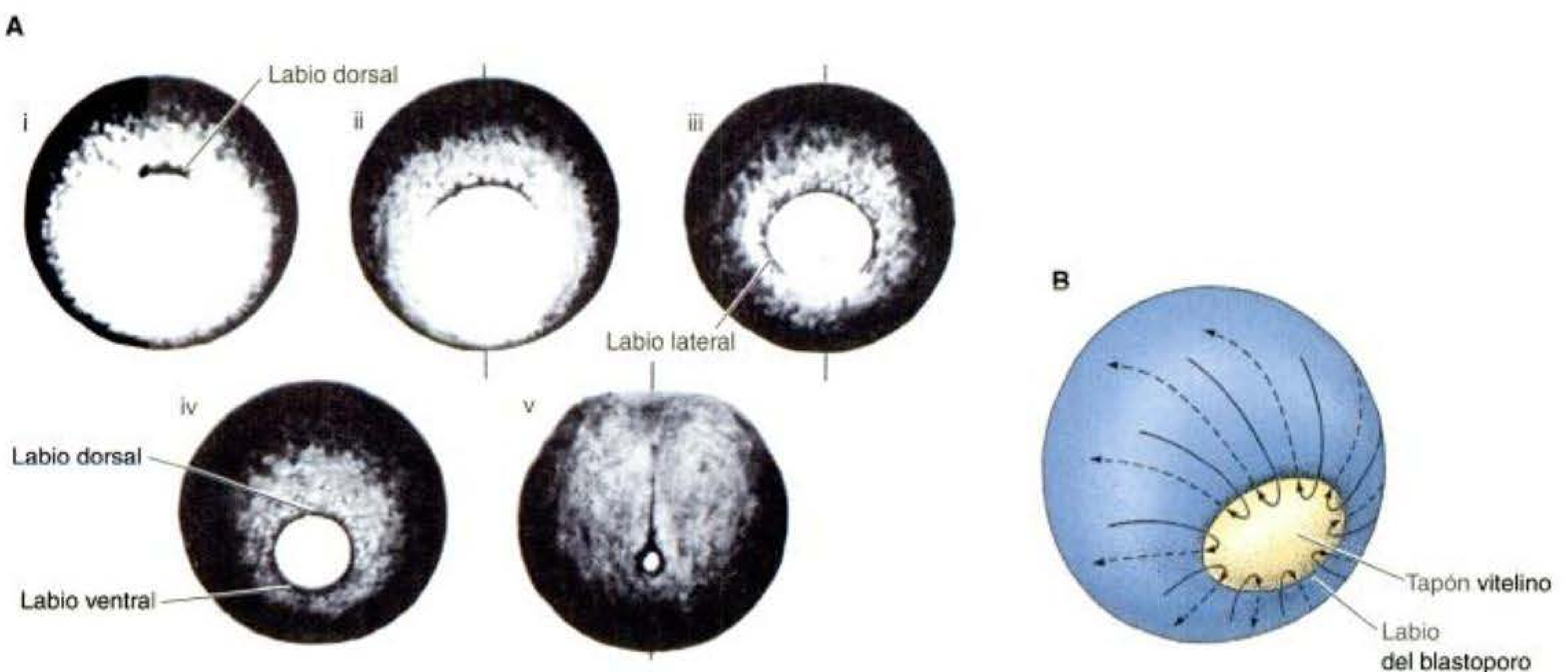


Fig. 10-9. Epibolia del ectodermo. **A.** Cambios en la región alrededor del blastoporo a medida que son formados los labios dorsal, lateral y ventral de manera sucesiva. Cuando el labio ventral completa el círculo, el endodermo llega a internalizarse progresivamente. Los números ii-v corresponden a las figuras 10-7 B-E, respectivamente. **B.** Resumen de los movimientos de epibolia del ectodermo y de la involución de las células mesodérmicas que migran hacia el blastoporo y luego bajo la superficie. El endodermo por debajo del labio del blastoporo (el tapón vitelino) no es móvil y es encerrado por estos movimientos. (A, de Balinsky 1975; fotografías cortesía de B. I. Balinsky.)

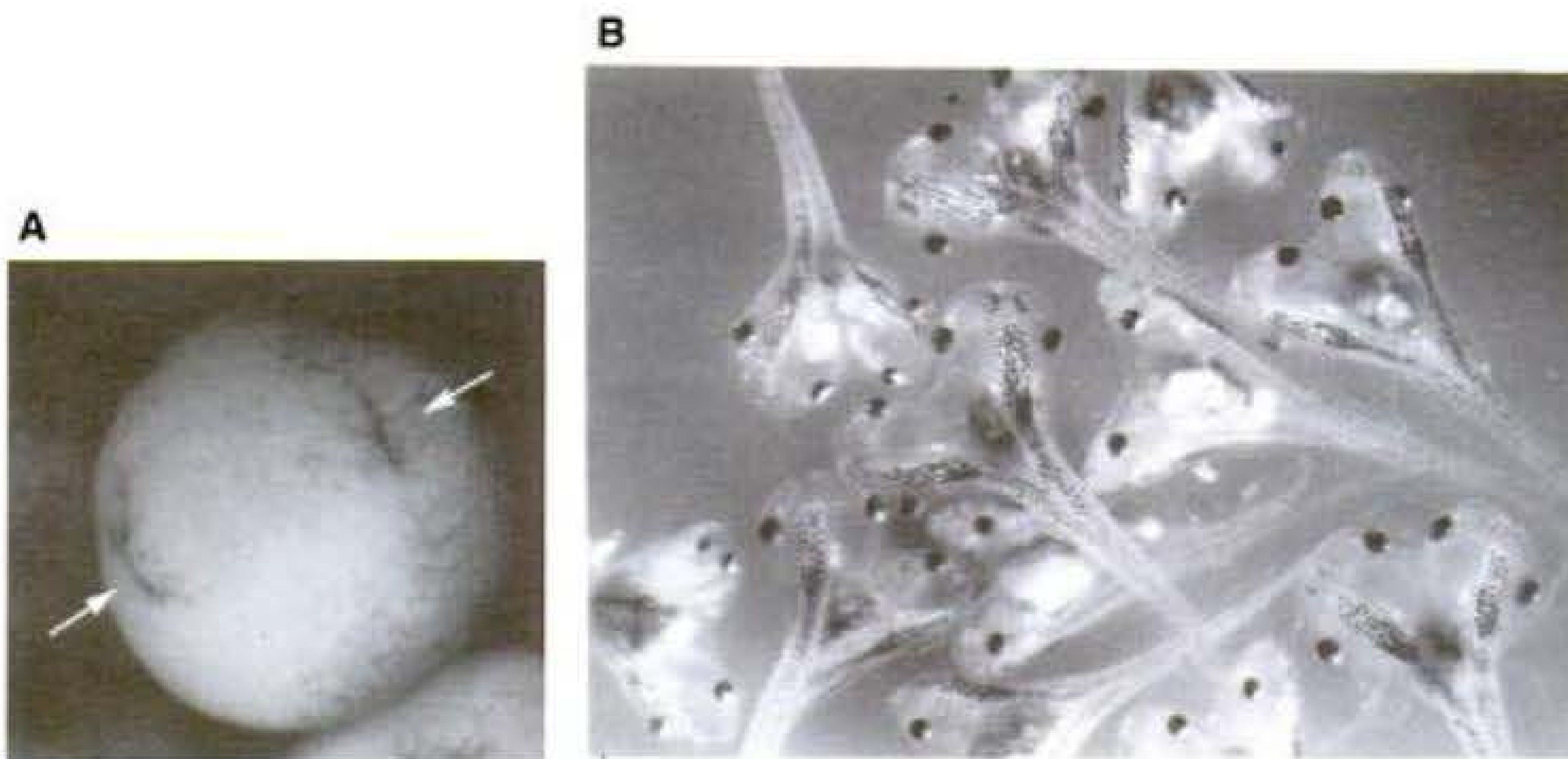


Fig. 10-10. Blastoporos gemelos producidos por la rotación del lado ventral (punto de entrada del espermatozoide) hacia arriba de los huevos de *Xenopus* sin capa gelatinosa en el momento de la primera segmentación. **A.** Dos blastoporos son instruidos para formar: el original (opuesto al punto de entrada del espermatozoide) y el nuevo creado por el desplazamiento del material citoplasmático. **B.** Estos huevos desarrollan dos ejes completos, que forman renacuajos gemelos unidos (siameses) ventralmente. (Fotografías cortesía de J. Gerhart.)

mediante la combinación de la rotación del espermatozoide orientada naturalmente con una rotación inducida de manera artificial en el huevo (cigoto). Black y Gerhart (1985, 1986) dejaron que se produjera la rotación inicial dirigida del espermatozoide, pero luego inmovilizaron a los cigotos en gelatina y cuidadosamente los centrifugaron de modo tal que el citoplasma interno fluyó *hacia* el punto de entrada del espermatozoide. Cuando luego se les permitió a los cigotos centrifugados desarrollarse en el agua normal, se formaron dos labios dorsales del blastoporo, que condujeron a la formación de larvas gemelas unidas (fig. 10-10). Un determinante dorsal es redistribuido por esta centrifugación.

Parece que la rotación cortical le permite a las blastómeras vegetales opuestas al punto de entrada del espermatozoide inducir a las células por encima de ellas para iniciar la gastrulación. Gimlich y Gerhart (1984), utilizaron experimentos de trasplante en embriones de *Xenopus* de 64 células, y demostraron que las tres blastómeras vegetales opuestas al punto de entrada del espermatozoide son capaces de inducir la formación del labio dorsal del blastoporo y de un eje dorsal completo cuando son trasplantadas hacia embriones irradiados con UV (que de otro modo no son capaces de iniciar una gastrulación apropiada: fig. 10-11A). Además, estas tres blastómeras, que subyacen a la región prospectiva del labio dorsal, pueden también inducir un blastoporo secundario y un eje cuando son trasplantados hacia el lado ventral de un embrión normal sin irradiar (fig. 10-11B). Holowacz y Elinson (1993) hallaron que el citoplasma cortical de las células vegetales dorsales del embrión de *Xenopus* de 16 células pudo inducir la formación de ejes secundarios cuando se lo inyectó en células vegetales ventrales. Ni el citoplasma cortical de las células animales ni el citoplasma profundo de las células ventrales pudo inducir tales ejes. Más adelante en este capítulo, se proporcionará evidencia que indica que esta señal dorsal es el factor de transcripción β-catenina.

Invaginación e involución

La gastrulación de anfibios es primero visible cuando un grupo de células endodérmicas marginales sobre la superficie dorsal de la blástula se hunde en el embrión. Las superficies externas (**apical**) de estas células se estrechan de un modo espectacular, mientras que sus extremos internos (**basal**) se expanden. La longitud apical-basal de estas células se incrementa enormemente para producir la característica forma de "botella". En salamandras, estas células de botella parecen tener un papel activo en los movimientos tempranos de la gastrulación. Johannes Holtfreter (1943, 1944) halló que las células de botella de la gástrula temprana de salamandra podían adherirse al cubreobjetos de vidrio y conducir los movimientos de las células adheridas a él. Aún más convincentes fueron los experimentos de recombinación de Holtfreter. Cuando las células de la zona marginal dorsal (que normalmente darían origen al labio dorsal del blastoporo) fueron extirpadas y colocadas sobre tejido endodérmico prospectivo interno, ellas formaron células de botella y se hundieron por debajo de la superficie del endodermo interno (fig. 10-12). Además, a medida que ellas se hundían, creaban una depresión que se asemejaba al blastoporo temprano. Por lo tanto, Holtfreter afirmó que la capacidad para invaginarse en la profundidad del endodermo es una propiedad innata de las células de la zona marginal dorsal.

SITIO WEB 10.1 **Demostración de las afinidades de los tejidos (Demonstrating tissue affinites).** Las afinidades de los tejidos que Holtfreter predijo han sido demostradas cuantitativamente por nuevos estudios que miden las tensiones superficiales de las diferentes capas de células.

La situación en el embrión de rana es algo diferente. R. E. Keller y sus estudiantes (Keller 1981; Hardin y Keller 1988) han demostrado que aunque las células de botella de *Xenopus* pueden jugar un papel en el inicio de la involución de la zona marginal a medida que ellas adquieren forma de botella, ellas no son esenciales para que continúe la gastrulación. El característico cambio de forma de las células de botella es necesario para iniciar la gastrulación; es el estrechamiento de estas células el que forma primero la hendidura parecida al blastoporo. Sin embargo, después de iniciar estos movimientos, las células de botella de *Xenopus* no son necesarias mucho más para la gastrulación. Cuando las células de botella son extirpadas después de su formación, continúa la involución y la formación y cierre del blastoporo.

El principal factor en el movimiento de las células hacia el embrión parece ser la involución de las células marginales subsuperficiales, en lugar de las células superficiales. La internalización del endodermo y del mesodermo es iniciada por un movimiento denominado **rotación vegetal**. Al menos 2 horas antes de la formación de las células de botella, los movimientos celulares internos impulsan a las células del suelo dorsal del blastocele ha-

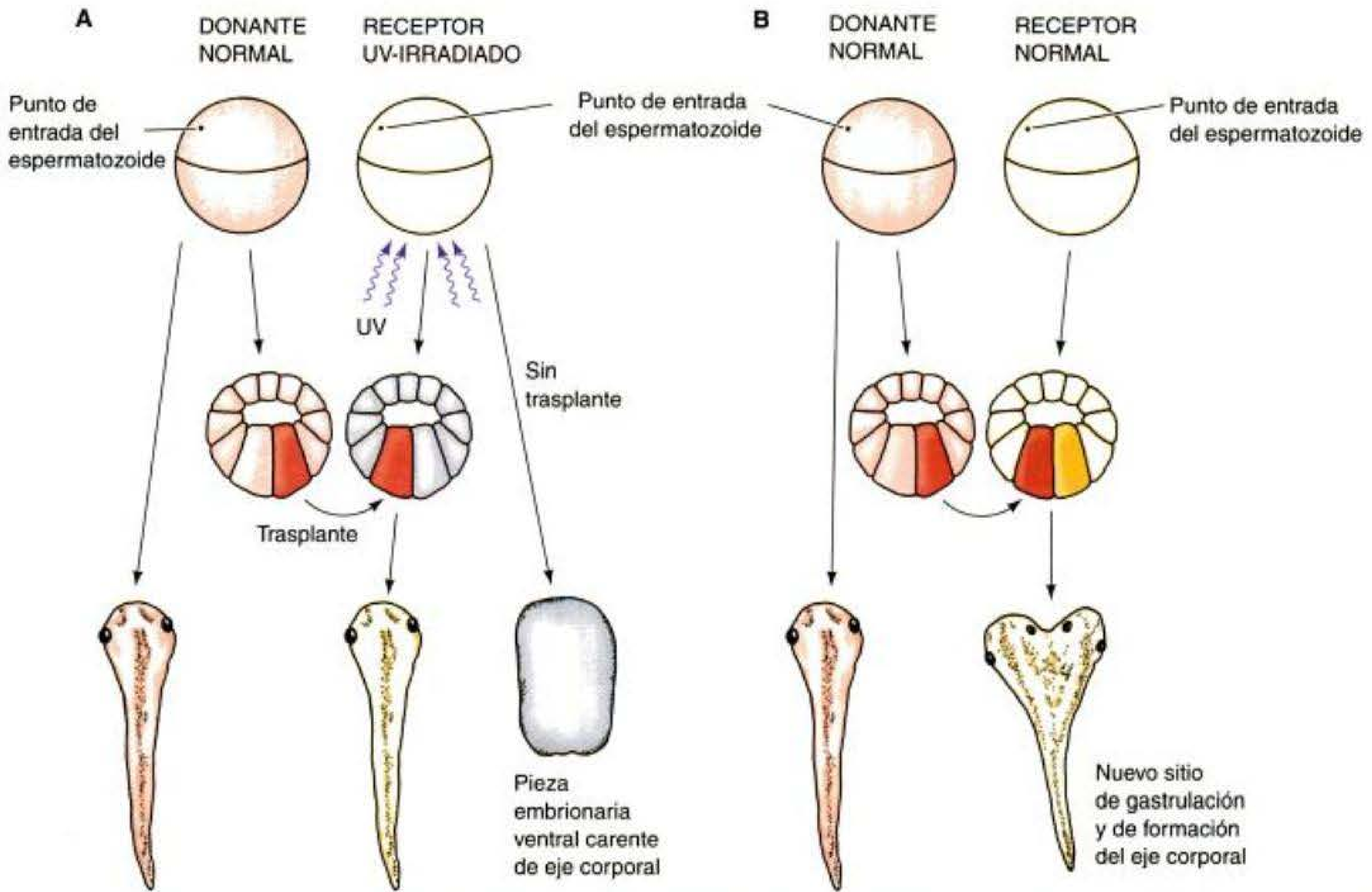


Fig. 10-11. Experimentos de trasplante en embriones de anfibio de 64 células que demuestran que las células vegetales subyacentes a la región prospectiva del labio dorsal del blastoporo son responsables de producir el comienzo de la gastrulación. (A) Rescate de embriones irradiados mediante el trasplante de blastómeras vegetales dorsales de un embrión normal hacia una cavidad producida por la extirpación de un número similar de células vegetales. Un cigoto irradiado sin este trasplante no puede experimentar la gastrulación normal. (B) Formación de un nuevo sitio de gastrulación y de un eje del cuerpo mediante el trasplante de las células vegetales más dorsales de un embrión hacia la región vegetal más ventral de otro embrión. (Según Gimlich y Gerhart 1984.)

cia el casquete animal (fig. 10-13). Esta rotación coloca al endodermo prospectivo faríngeo adyacente al blastocele e inmediatamente por arriba del mesodermo en involución. Estas células luego migran a lo largo de la superficie basal del techo del blastocele (fig. 10-13A-D; Nieuwkoop y Florschütz 1950; Winklbauer y Schürfeld 1999; Ibrahim y Winklbauer 2001). La capa superficial de las células marginales es tirada hacia adentro para formar el revestimiento endodérmico del arquenterón, simplemente debido a que ésta está unida a células profundas que migran activamente. Mientras que la eliminación experimental de las células de botella no afecta la involución de las células de la zona marginal superficial o profunda hacia el embrión, la eliminación de las células profundas de la **zona marginal que involuciona (ZMI)** detiene la formación del arquenterón.

La extensión convergente del mesodermo dorsal

La involución comienza dorsalmente, dirigida por el endomesodermo faríngeo* y la placa precordal. Estos tejidos migrarán más anteriormente por debajo del ectodermo superficial. El siguiente tejido en entrar al labio del blastoporo dorsal contiene precursores de la notocorda y

* El endodermo faríngeo y el mesodermo de la cabeza no pueden ser separados experimentalmente en este estadio, por esta razón a veces son referidos colectivamente como endomesodermo faríngeo. La notocorda es la unidad básica del mesodermo dorsal, pero se piensa que la porción dorsal de los somitas puede también tener propiedades semejantes.

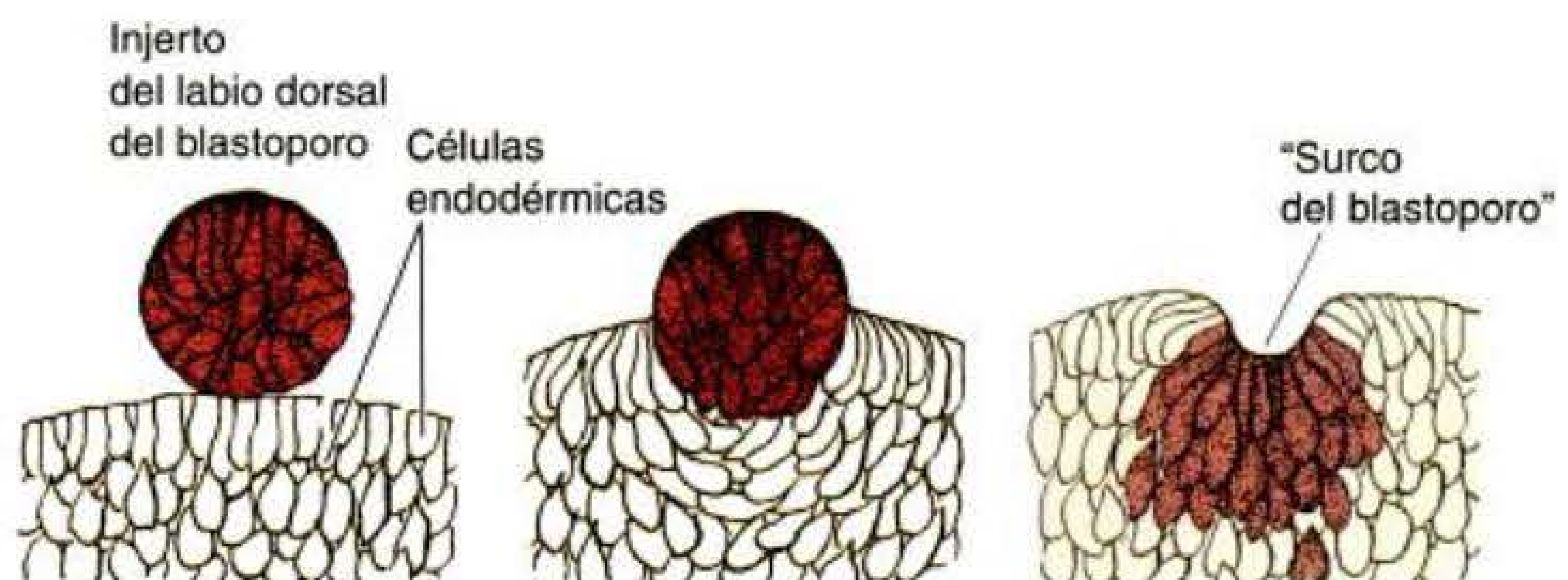


Fig. 10-12. Un injerto de células desde la zona marginal dorsal de un embrión de salamandra se hunde en una capa de células endodérmicas y forma un surco parecido al blastoporo. (Según Holtfreter 1944.)

de los somitas. Mientras tanto, a medida que el labio del blastoporo se expande para tener los lados dorsolateral, lateral y ventral, el mesodermo cardíaco, el mesodermo renal y el mesodermo ventral prospectivos entran en el embrión.

La figura 10-13D-F describe la conducta de las células de la ZMI en sucesivos estadios de la gastrulación del *Xenopus* (Keller y Schoenwolf 1977; Keller 1980, 1981; Hardin y Keller 1988). La ZMI es originalmente de varias capas de espesor. Poco antes de su involución a través del labio del blastoporo, varias capas de las células profundas de la ZMI se intercalan radialmente para formar una capa delgada y ancha. Esta intercalación extiende aún más a la ZMI hacia vegetal. Al mismo tiempo, las células superficiales se extienden mediante división y aplanamiento. Cuando las células profundas alcanzan el labio del blastoporo, involucionan hacia el embrión y dan inicio a un segundo tipo de intercalación; la que causa una **extensión convergente** a lo largo del eje mediolateral (fig. 10-13F) que integra varias corrientes mesodérmicas para formar una banda larga y estrecha. Este movimiento se asemeja al tránsito sobre una autopista cuando varios carriles deben confluir para formar uno solo. La parte anterior de esta banda migra hacia el casquete animal. Por lo tanto, la corriente mesodérmica continúa migrando hacia el polo animal y la capa de células superficiales (incluidas las células de botella) que la recubre es impulsada pasivamente hacia el polo animal, formando de este modo el techo endodérmico del arquenterón (véanse figs. 10-7 y 10-13E). Las intercalaciones radial y mediolateral de las células de la capa profunda parecen ser responsables del movimiento continuo del mesodermo hacia el embrión.

Dos fuerzas principales parecen dirigir la extensión convergente. La primera fuerza es la cohesión celular diferencial. Durante la gastrulación, los genes que codifican las proteínas de adhesión **protocadherina paraxial** y **protocadherina axial**, llegan a ser expresados específicamente en el mesodermo paraxial (que da origen a los somitas) y en la notocorda, respectivamente (fig. 10-14).

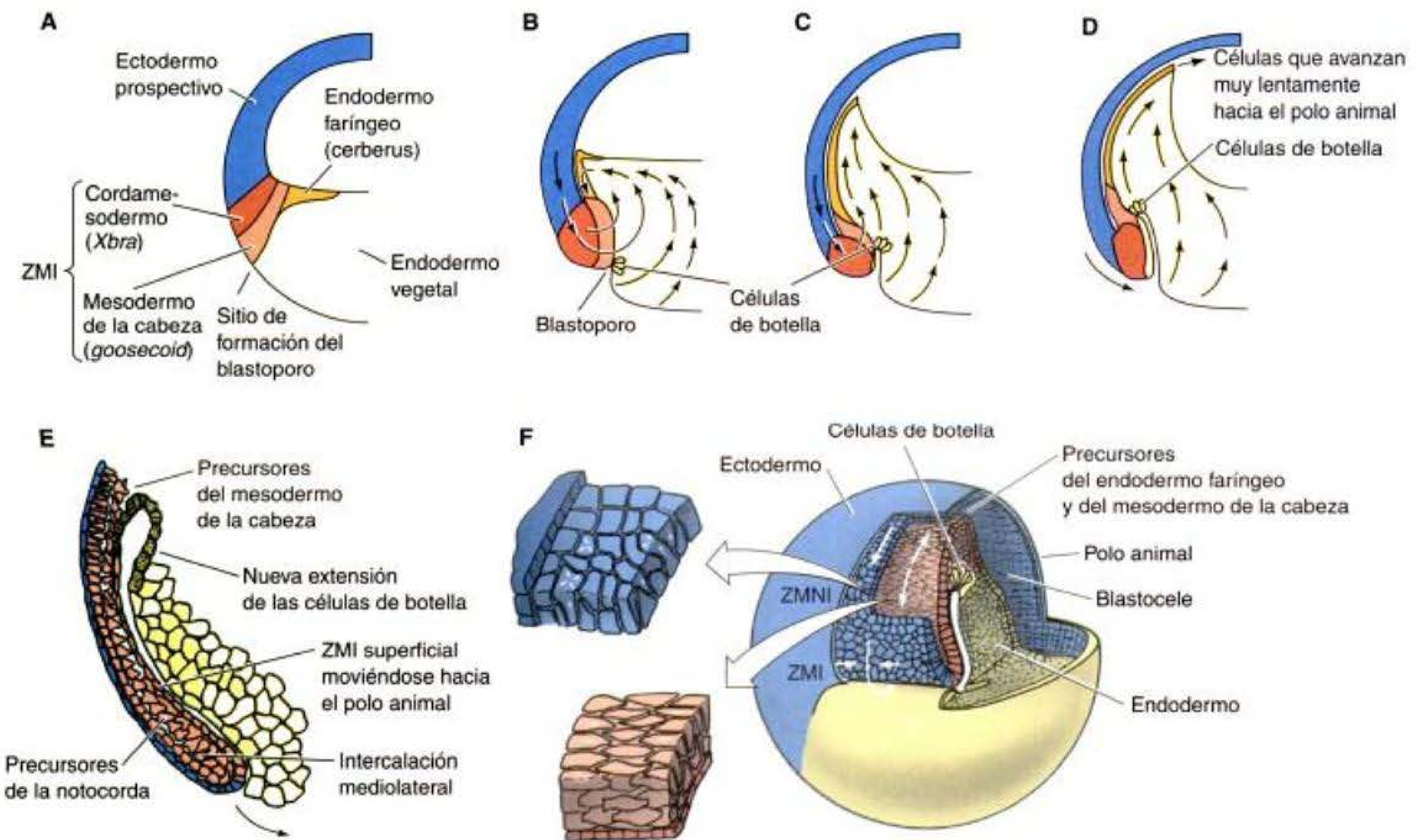


Fig. 10-13. Movimientos tempranos de la gastrulación del *Xenopus*. El área amarilla es endodermo vegetal. Lo naranja representa al endodermo prospectivo faríngeo (como se observa por la expresión de Cerberus). Naranja oscuro representa al mesodermo prospectivo de la cabeza (como se observa por la expresión de Goosecoid) y el cordamesodermo (indicado por la expresión de Xbra) es rojo. El ectodermo prospectivo es azul. **A.** Al comienzo de la gastrulación se forma la zona marginal interna (*ZMI*). **B.** La rotación vegetal (flechas blancas) empuja al endodermo prospectivo faríngeo hacia el lado del blastocele. **C, D.** Los movimientos vegetales endodérmicos empujan al endodermo faríngeo hacia adelante y conducen pasivamente al mesodermo hacia el embrión y hacia el polo animal. El ectodermo comienza la epibolia. **E.** A medida que continúa la gastrulación, se aplanan las células marginales profundas y las células anteriormente superficiales forman la pared del arquenterón. **F.** Intercalación radial, vista hacia abajo en el labio dorsal del blastoporo desde la superficie dorsal. En la zona marginal que no involuciona (ZMNI) y en la porción superior de la ZMI, células profundas (mesodérmicas) son intercaladas radialmente para producir una delgada banda de células aplanadas. Este adelgazamiento de varias capas en unas pocas provoca la extensión hacia el labio del blastoporo. Justo por arriba del labio, la intercalación mediolateral de las células produce tensiones que tiran a la ZMI sobre el labio. Después de involucionar sobre el labio, la intercalación mediolateral continúa, elongando y estrechando el mesodermo axial. (Según Wilson y Keller 1991 y Winklbauer y Schürfeld 1999.)

Una forma dominante negativa experimental de protocadherina paraxial (que es secretada en lugar de ser unida a la membrana celular) evita la extensión convergente* (Kim y col. 1998). Además, el dominio de expresión de la protocadherina paraxial separa a las células mesodérmicas del tronco, que experimentan extensión convergente, de las células del mesodermo de la cabeza, que no lo hacen.

El segundo factor que regula la extensión convergente es el flujo de calcio. Wallingford y col. (2001) hallaron que ondas de iones calcio espectaculares elevan a través de los tejidos dorsales que experimentan extensión convergente, y causan ondas de contracción dentro del tejido. Los iones de calcio son liberados desde almacenamientos intracelulares y son requeridos para la extensión convergente. Si la liberación de los iones de calcio es bloqueada, la especificación celular normal todavía se produce, pero el mesodermo dorsal no converge ni se extiende (fig. 10-15). Se piensa que este calcio regula la contracción de los microfilamentos de actina.

Curiosamente, la región especificada para convertirse en la cabeza se mantiene fuera de la extensión convergente. Este fenómeno es debido a la expresión del gen *Otx2*. Este gen es el homólogo vertebrado del gen *otd* (*orthodenticle*) de *Drosophila* y como el gen *otd*, *Otx2* codifica un factor de transcripción expresado en la región más anterior del embrión. La proteína Otx2 es crítica en la formación de la cabeza y activa a los genes involucrados en la formación del cerebro anterior. Además de especificar los tejidos anteriores del embrión, Otx2 evita que la célula que lo expresa experimente convergencia y extensión. Uno de los genes que Otx2 activa es el gen *calponin* de *Xenopus* (Morgan y col. 1999). Calponin es una proteína que se une a la actina y a la miosina para evitar que los microfilamentos de actina se contraigan.

Migración del mesodermo en involución

A medida que progresan los movimientos, la extensión convergente continúa estrechando y alargando la zona marginal en involución. La ZMI contiene al endodermo prospectivo del techo del arquenterón en su capa superficial (ZMI_s) y las células del mesodermo prospectivo, incluidas aquellas de la notocorda, en su región profunda (ZMI_p). Durante el tercio medio de la gastrulacion, la lámina en expansión del mesodermo converge hacia la línea media del embrión. Este proceso es dirigido por la continua intercalación mediolateral de células a lo largo del eje anteroposterior, y de este modo estrecha aún más la banda. Hacia el final de la gastrulación, y de este modo estrecha la notocorda localizada centralmente se separa del mesodermo somítico a ambos lados de ésta y las células de la notocorda se elongan separadamente (Wilson y Keller 1991). Esto podría en parte ser una consecuencia de las diferentes moléculas de adhesión en los mesodermos axial y paraxial (véase fig. 10-14; Kim y col. 1998). Esta extensión convergente del mesodermo parece ser autónoma, debido a que los movimientos de estas células se producen aun si esta región del embrión es aislada experimentalmente del resto del embrión (Keller 1986).

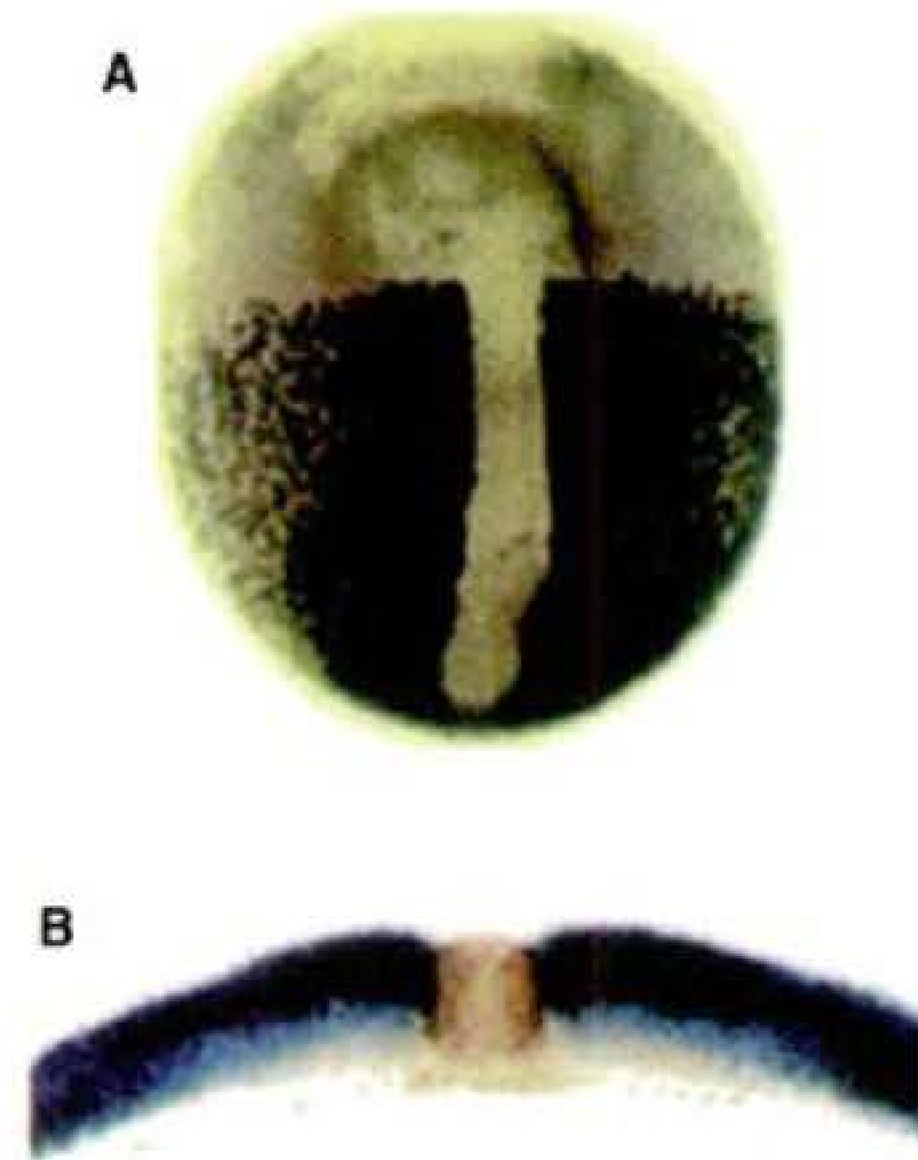


Fig. 10-14. Expresión de la protocadherina paraxial. **A.** La expresión de la protocadherina paraxial durante la gastrulación tardía (áreas oscuras) muestra la característica regulación en menos en la notocorda y la ausencia de expresión en la región de la cabeza. **B.** Sección transversal con doble tinción a través de una gástrula tardía de *Xenopus* que muestra la separación de la notocorda (tinción marrón para Cordina) y el mesodermo paraxial (tinción azul para protocadherina paraxial) (Fotografías cortesía de E. M. De Robertis.)

Durante la gastrulación, el casquete animal y la **zona marginal que no involuciona (ZMNI)** se expanden por epibolia para cubrir al embrión en su totalidad. Estas células formarán el ectodermo superficial. La porción dorsal de la ZMNI se extiende más rápidamente hacia el blastoporo que la porción ventral, lo que provoca que el labio del blastoporo se mueva hacia el lado ventral. Mientras que las células mesodérmicas que entran a través del labio dorsal del blastoporo dan origen al mesodermo axial dorsal (notocorda y somitas), el resto del mesodermo del cuerpo (que forma el corazón, los riñones, la sangre, los huesos y partes de otros órganos) ingresa a través de los labios ventral y lateral del blastoporo para crear el **manto mesodérmico**. El endodermo es derivado de las células ZMI_s que forman el revestimiento del techo del arquenterón y de las células vegetales subblastoporales que se convierten en el suelo del arquenterón (Keller 1986).

Epibolia del ectodermo

Mientras que la involución se está produciendo en los labios del blastoporo, los precursores ectodérmicos están expandiéndose sobre la totalidad del embrión. El principal mecanismo de epibolia en la gastrulación de *Xenopus* parece ser un incremento en el número celular (a través de la división) acoplado con una integración simultánea

*Las proteínas dominante negativo son formas mutadas de la proteína tipo salvaje que interfieren con la función normal de la proteína tipo salvaje. Por lo tanto, una proteína dominante negativo tendrá un efecto similar a la mutación de pérdida de función en el gen que codifica una proteína particular.

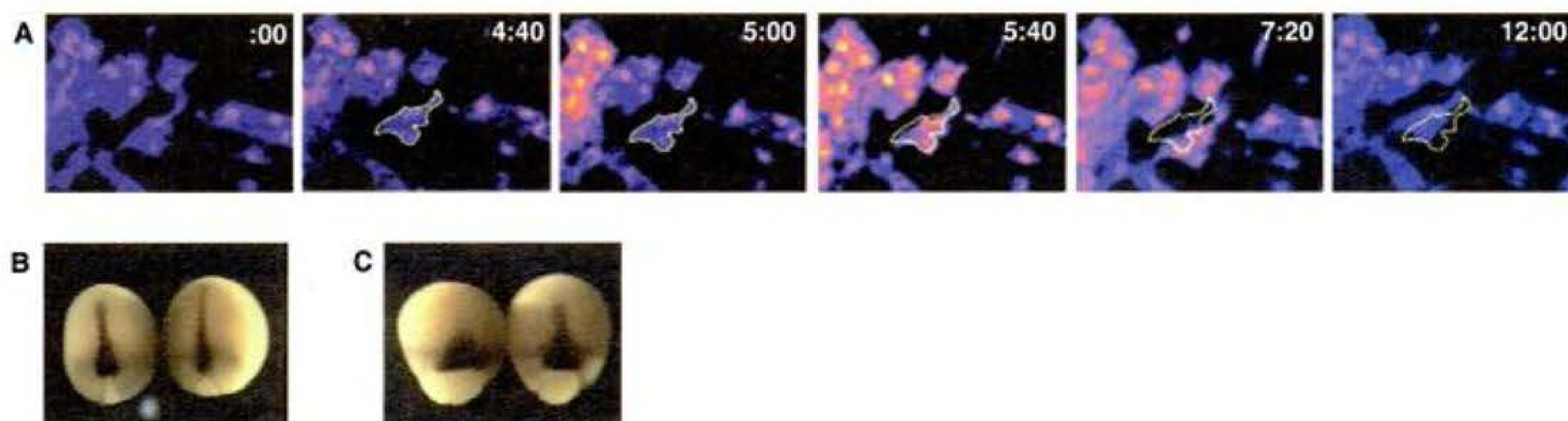


Fig. 10-15. Importancia de las ondas de calcio para la extensión convergente. **A.** Onda de iones calcio en la zona marginal dorsal de *Xenopus* visualizada por colorantes activados por calcio y mediante microscopio confocal. Las ondas se mueven a través de las células de izquierda a derecha y se disipan, provocan que las células se muevan de manera espectacular. Primero se mueven en dirección de la onda y luego se mueven hacia ésta (de derecha a izquierda), moviéndose más lejos que su posición original. **B.** Dos embriones control de *Xenopus* en el estadio de gástrula tardía, teñidos para el mRNA notocordal *Xnot*. La extensión convergente se ha producido y el blastoporo está casi completamente cerrado. **C.** Dos embriones de la misma edad tratados con una droga que evita la liberación de calcio. Las tinciones para *Xnot* revelan que las notocordas no tienen convergencia ni extensión y que el blastoporo se mantiene abierto. (Según Wallingford y col. 2001; fotografías cortesía de S. F. Fraser.)

de varias capas profundas en una (fig. 10-16; Keller y Schoenwolf 1977; Keller 1980). Los resultados de estas expansiones son la epibolia de las células superficiales y profundas del casquete animal y de la ZMNI sobre la superficie del embrión (Keller y Danilchik 1988; Saka y Smith 2001). La mayoría de las células de la zona marginal, como se mencionó previamente, involucionan para unirse a la corriente de células mesodérmicas dentro del embrión. A medida que el ectodermo epiboliza sobre la totalidad del embrión, finalmente internaliza a todo el endodermo dentro de éste. En este punto, el ectodermo cubre al embrión, el endodermo está localizado dentro del embrión y el mesodermo se posiciona entre ellos.

SITIO WEB 10.2 **Migración del manto mesodérmico (Migration of the mesodermal mantle).** Diferentes velocidades de crecimiento acopladas con la intercalación de capas celulares permiten al mesodermo expandirse de un modo rigurosamente coordinado.

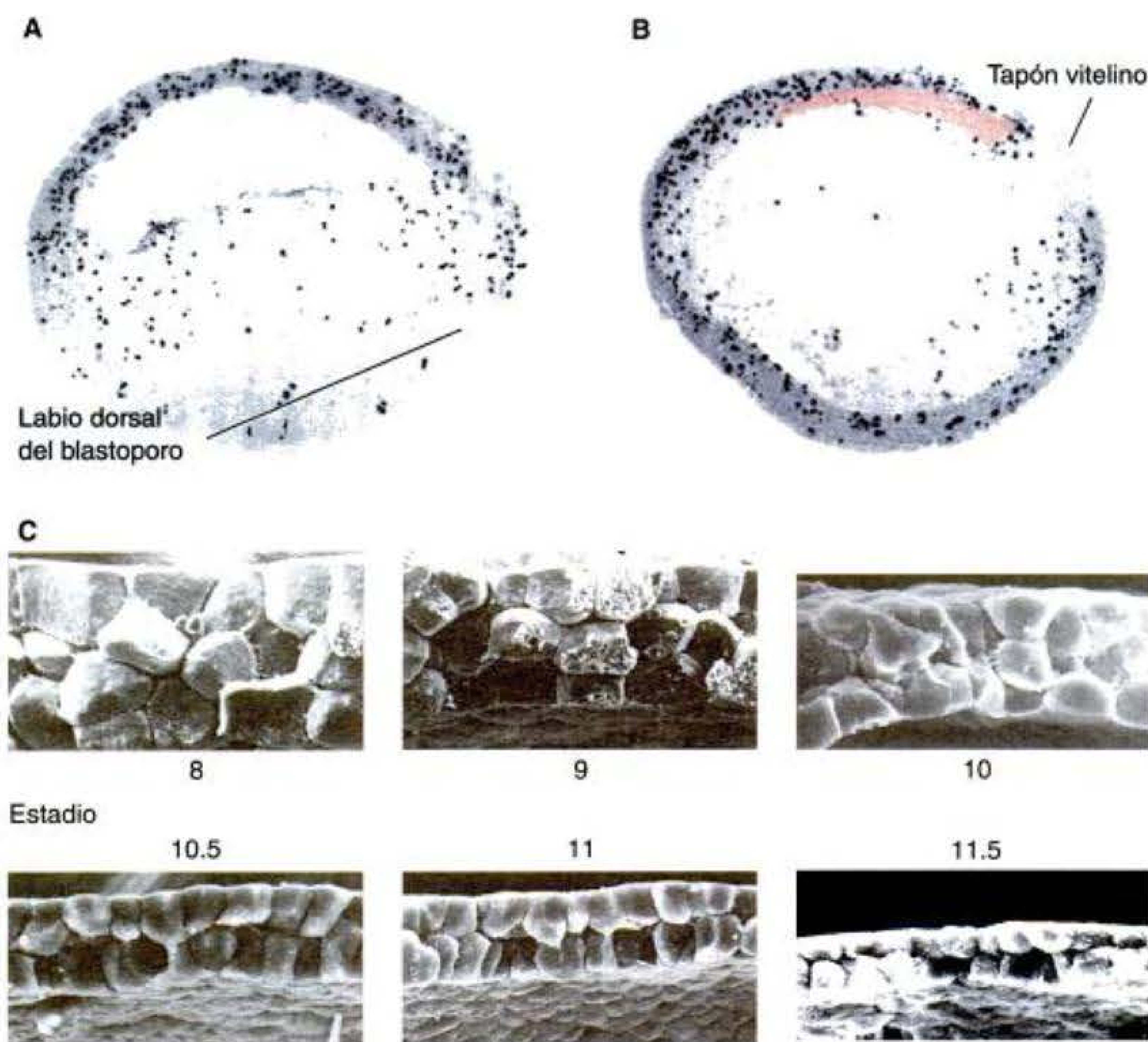


Fig. 10-16. La epibolia del ectodermo es llevada a cabo por la división celular y la intercalación. **A, B.** División celular en el ectodermo presuntivo. La división celular se muestra mediante la tinción para la histona 3 fosforilada, un marcador de mitosis. Los núcleos teñidos aparecen negros. En la gástrula temprana (**A**; estadio 10.5), la mayor parte de la división celular se produce en el ectodermo presuntivo del hemisferio animal. En la gástrula tardía (**B**; estadio 12), la división celular puede verse en toda la capa ectodérmica. (Curiosamente, el mesodermo dorsal no muestra división celular). **C.** Microfotografía electrónica de barrido del techo del blastocele de *Xenopus*, que muestra los cambios en la forma y la organización celular. Los estadios 8 y 9 son blástulas; los estadios 10-11.5 representan progresivamente a la gástrula tardía. (**A, B**, según Saka y Smith 2001, fotografías cortesía de los autores; **C**, de Keller 1980; fotografías cortesía de R. E. Keller.)

Información adicional y especulaciones

Fibronectina y las rutas para la migración mesodérmica

Cómo son informadas las células en involución hacia dónde ir una vez que ingresan en el embrión? En muchos anfibios, parece ser que los precursores mesodérmicos en involución migran hacia el polo animal sobre un entramado de fibronectina secretado por las células del techo del blastocele (fig. 10-17A,B). Poco tiempo antes de la gastrulación, el ectodermo presuntivo del techo del blastocele secreta una matriz extracelular que contiene fibrillas de fibronectina (Boucaut y col. 1984; Nakatsuji y col. 1985). Las células mesodérmicas que involucionan parecen viajar a lo largo de estas fibrillas de fibronectina. La confirmación de esta hipótesis fue obtenida al sintetizar químicamente una fibronectina "falsa" que puede competir con la fibronectina auténtica de la matriz extracelular. Las células se unen a una región de la proteína fibronectina que contiene una secuencia de tres aminoácidos (Arg-Gly-Asp; RGD). Boucaut y colaboradores inyectaron grandes cantidades de pequeños péptidos que contenían esta secuencia en los blastoceles de los embriones de salamandra poco antes de comenzar la gastrulación. Si la fibronectina fuera esencial para la migración celular, entonces las células que unen este fragmento de péptido soluble en lugar de la fibronectina extracelular verdadera deberían detener la migración. Incapaces de encontrar su "camino", las células mesodérmicas deberían cesar su involución. Esto es precisamente lo que sucede (fig. 10-17C-F). Células que no migran fueron vistas a lo largo de la parte inferior del ectodermo en los embriones experimentales. En su lugar, los precursores mesodérmicos se mantenían fuera de los embriones, formando una masa celular intrincada. Otros péptidos sintéticos pequeños (incluidos otros fragmentos de la molécula de fibronectina) no impidieron la migración. Por lo tanto la matriz extracelular que contiene fibronectina parece proporcionar sustrato para la adhesión así como señales para la dirección de la migración celular. Shi y colegas (1989) demostraron que las células ZMI de la salamandra migrarían en la dirección incorrecta si eran colocados en su camino entramados extras de fibronectina.

En *Xenopus*, la fibronectina es secretada de modo semejante por las células que revisten el techo del blastocele. El resultado (fig. 10-17A,B) es una banda de fibronectina que reviste al techo, incluida la hendidura de Brachet, la parte del techo del blastocele extendiéndose vegetalmente sobre el lado dorsal. La rotación vegetal pone al endodermo faríngeo y al mesodermo en involución en contacto con estas fibrillas de fibronectina (Winklbauer y Schürfeld 1999). La extensión convergente empuja a las células mi-

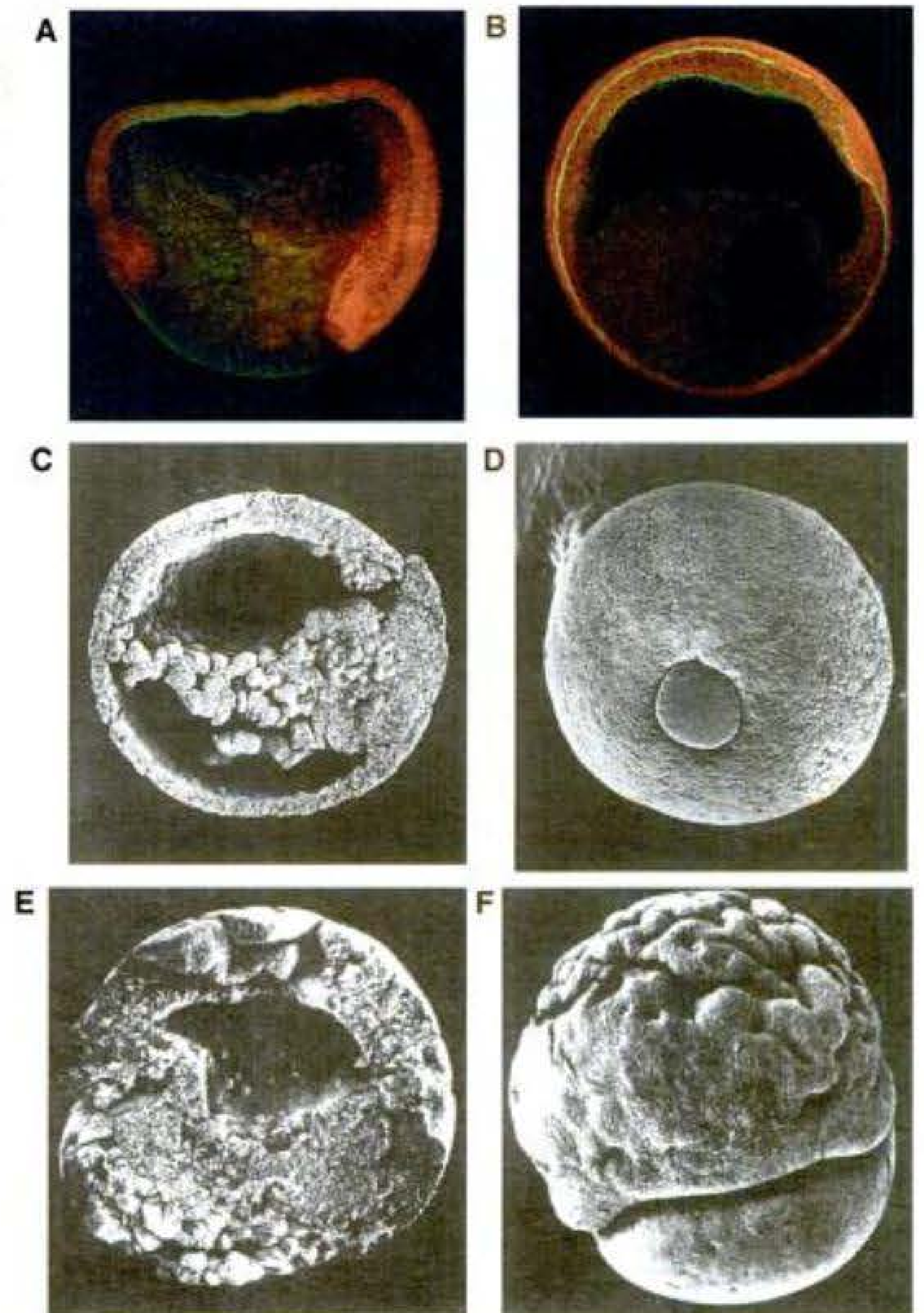


Fig. 10-17. Fibronectina y gastrulación en los anfibios. **A, B.** Sección sagital del embrión de *Xenopus* en la gastrulación **A** temprana y **B** tardía. El entramado de fibronectina sobre el techo del blastocele es identificado mediante tinción con anticuerpo fluorescente (amarillo) mientras que las células embrionarias son contrateñidas de rojo. **C-F.** Microfotografías electrónicas de barrido **C, D** de un embrión de salamandra normal inyectado en el estadio de blástula con una solución control y **E, F** un embrión del mismo estadio inyectado con fragmentos de fibronectina que se unen a la célula. **C.** Sección durante la gastrulación media. **D.** El tapón vitelino hacia el final de la gastrulación. **E, F.** Las etapas que terminan con la detención de la gastrulación, en las cuales los precursores mesodérmicos, que ya unieron la fibronectina sintética, no pueden reconocer la ruta de migración de la fibronectina normal. El arquenterón no se puede formar y los precursores mesodérmicos que ya unieran dos se mantienen sobre la superficie. (**A, B** de Marsden y DeSimeone 2001, fotografías cortesía de los autores; **C-F** de Boucaut y col. 1984, fotografías cortesía de J.-C. Boucaut y J.-P. Thiery.)

grantes hacia arriba en dirección al polo animal. Las fibrillas de fibronectina son necesarias para que las células del mesodermo de la cabeza se aplanen y extiendan amplios procesos (lameliformes) en la dirección de la migración (Winklbauer y col. 1991; Winklbauer y Keller 1996). Los estudios que utilizan inhibidores de la formación de fibronectina han demostrado que estas fibrillas de fibronectina son necesarias para la dirección de migración del mesodermo, el mantenimiento de la intercalación de las células del casquete animal y la iniciación de la intercalación radial en la zona marginal (Marsden y DeSimeone 2001).

Se piensa que las células mesodérmicas se adhieren a la fibronectina a través de la proteína integrina $\alpha_5\beta_1$ (Alfandari y col. 1995). La migración del mesodermo puede también detenerse mediante la microinyección de anticuerpos contra fibronectina o contra la subunidad a_5 de la integrina, que sirve como parte del receptor de fibronectina (D'Arribère y col. 1988, 1990). Alfandari y col. (1995) han demostrado que la subunidad a_5 de la integrina aparece sobre las células mesodérmicas justo antes de la gastrulación, persiste sobre sus superficies durante la gastrulación y desaparece cuando la gastrulación termina. La integrina coordina la interacción del techo del blastocele con los microfilamentos de actina en las células mesendodérmicas en migración. Esta interacción permite el incremento de la tracción y la extensión de la migración (Davidson y col. 2002). Parece, entonces, que la síntesis coordinada de fibronectina y de su receptor puede ser la señal temporal para que el mesodermo comience, continúe y detenga la migración.

FORMACIÓN DEL EJE EN LOS ANFIBIOS: EL FENÓMENO DEL ORGANIZADOR

La determinación progresiva de los ejes en los anfibios

Los ejes de los vertebrados no se forman a partir de determinantes localizados, como en *Drosophila*. En su lugar, se originan progresivamente a través de una secuencia de interacciones entre las células vecinas. La formación de los ejes en los anfibios es un ejemplo de desarrollo regulativo. En el capítulo 3, se explicó el concepto de desarrollo regulativo, por el cual 1) una blastómera aislada tiene un potencial mayor que su destino embrionario normal y 2) el destino de la célula es determinado mediante interacciones entre las células vecinas. Tales interacciones son denominadas inducciones (véase cap. 6). Que tales interacciones inductivas fueran responsables de la determinación de los ejes en los anfibios fue demostrado por el laboratorio de Hans Spemann en la University of Freiburg (véase De Robertis y Aréchaga 2001; Sander y Fässler 2001). Los experimentos de Spemann y de sus estudiantes elaboraron las preguntas que los embriólogos experimentales se hicieron durante la mayor parte del siglo XX y ello resultó en un premio Nobel para Spemann en 1935. Más recientemente, los descubrimientos de las moléculas asociadas con estos procesos inductivos han proporcionado algunos de los momentos más emocionantes en la ciencia contemporánea.

El experimento que comenzó este programa de investigación fue realizado en 1903, cuando Spemann demostró que las blastómeras tempranas de tritón tenían núcleos idénticos, cada uno capaz de producir una larva entera. Su procedimiento fue ingenioso: Poco después de fecundar un ovocito de tritón, Spemann utilizó un pelo de bebé tomado de su hija para enlazar el cigoto en el plano de la primera segmentación. Luego estrechó parcialmente al cigoto, haciendo que todas las divisiones nucleares se mantuvieran sobre uno de los lados de la constricción. Finalmente, con frecuencia tan tarde como en el estadio de 16 células, un núcleo escaparía a través de la constricción hacia el lado sin núcleos. Luego la segmentación comenzaba también sobre este lado, con lo cual Spemann ajustó el lazo hasta que las dos mitades estuvieran completamente separadas. Se desarrollaron larvas gemelas, una ligeramente más vieja que la otra (fig. 10-18). Spemann concluyó desde sus experimentos que los núcleos tempranos del anfibio eran genéticamente idénticos y que cada célula era capaz de dar origen a un organismo entero.

Sin embargo, cuando Spemann llevó a cabo un experimento similar con la constricción aún longitudinal, pero perpendicular al plano de la primera segmentación (separando las futuras regiones dorsal y ventral en lugar de los lados derecho e izquierdo), obtuvo un resultado completamente diferente. Los núcleos continuaron dividiéndose sobre ambos lados de la constricción, pero solo un lado –el futuro lado dorsal del embrión– dio origen a una larva normal. El otro lado produjo una masa de tejido desorganizado de células ventrales, que Spemann denominó el *Bauchstück* –la pieza ventral. Esta masa de tejido era una bola de células epidérmicas (ectodermo) que contenía sangre y mesénquima (mesodermo) y células del intestino (endodermo), pero no estructuras dorsales como sistema nervioso, notocorda o somitas (fig. 10-19).

¿Por qué estos dos experimentos podían dar resultados diferentes? Una posibilidad fue que cuando el cigoto era dividido perpendicular al primer plano de segmentación, alguna sustancia *citoplasmática* no fue distribuida equitativamente entre las dos mitades. Felizmente, el huevo (estadio de cigoto) de salamandra fue un buen lugar para probar la hipótesis. Como se ha visto, luego de la fecundación de los ovocitos de anfibio hay movimientos espectaculares el citoplasma y en algunos anfibios estos movimientos exponen un área gris de forma de medialuna en la región directamente opuesta al punto de entrada del espermatozoide. Esta área ha sido denominada la **medialuna gris**. Además, el primer plano de segmentación separa normalmente a la medialuna gris de manera equitativa entre las dos blastómeras. Si estas células son luego separadas, se desarrollan dos larvas completas. Sin embargo, si este plano de segmentación fuera aberrante (en un acontecimiento natural poco frecuente o en un experimento), el material de la medialuna gris pasa solo hacia una de las dos blastómeras. Spemann halló que cuando estas dos blastómeras eran separadas, solo la blastómera con la medialuna gris se desarrollaba normalmente.

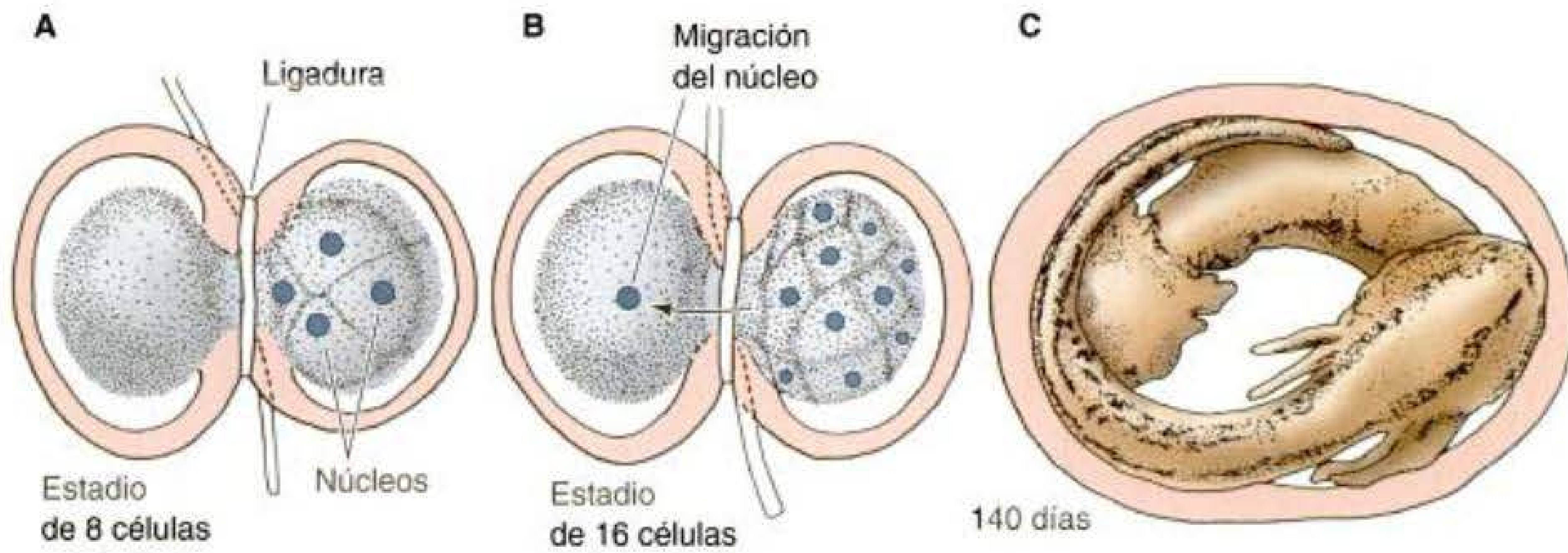


Fig. 10-18. Demostración de Spemann de la equivalencia nuclear en la segmentación del tritón. **A.** Cuando el ovocito fecundado del tritón *Triturus taeniatus* fue estrechado mediante una ligadura, el núcleo fue restringido a una mitad del embrión. La segmentación sobre este lado del embrión alcanza el estadio de 8 células, mientras que el otro lado se mantiene sin dividir. **B.** En el estadio de 16 células se permitió el ingreso de un solo núcleo a la mitad hasta ahora sin dividirse y la ligadura fue posteriormente estrechada para completar la separación de las dos mitades. **C.** Después de 140 días, cada lado había desarrollado un embrión normal. (Según Spemann 1938.)

SITIO WEB 10.3 **Embriología e individualidad (Embryology and individuality).** Un huevo (cigoto) por lo general produce solo un adulto; sin embargo, hay excepciones a esta regla. Spemann fue atraído a la embriología a través de la paradoja de la creación de más de un individuo desde un único cigoto.

Parecía, entonces, que algo en la región de la medialuna gris era esencial para el adecuado desarrollo embrionario. Pero ¿cómo funciona? ¿Qué papel juega en el desarrollo normal? La pista más importante vino del mapa de destino de esta área del huevo (cigoto), ya que demostró que la región de la medialuna gris da origen a las células que inician la gastrulación. Estas células forman el labio dorsal del blastoporo. Las células del labio dorsal están comprometidas a invaginarse dentro de la blástula, inician de este modo la gastrulación y la formación de la notocorda. Debido a que todo el futuro desarrollo del anfibio depende de la interacción de las células reorganizadas durante la gastrulación, Spemann especuló que la importancia del material de la medialuna gris residía en su capacidad para iniciar la gastrulación y en que los cambios críticos del desarrollo se producen durante la gastrulación.

En 1918, Spemann demostró que cambios enormes en el potencial celular tienen lugar a su vez durante la gastrulación. Él halló que las células de la gástrula temprana no estaban comprometidas, pero que los destinos de las células de la gástrula tardía estaban determinados. Spemann demostró esto mediante el intercambio de tejidos entre las gástrulas de dos especies de tritón cuyos embriones estaban pigmentados de modo diferente (fig. 10-20). Cuando una región de las células epidérmicas prospectivas de una gástrula *temprana* era trasplantada hacia un área en otra gástrula temprana donde el tejido neural se formaba normalmente, las células trasplantadas daban origen a tejido neural. Cuando tejido neural prospectivo de una gástrula temprana fue trasplantado a la región destinada a convertirse en la piel del vientre, el tejido neural se convertía en epidérmico (cuadro 10-1). Por lo tanto, estas gástrulas tempranas de tritón todavía no estaban comprometidas a destinos específicos. Se dice que tales células presentan **desarrollo regulativo** (es decir, **condicional** o **dependiente**) debido a que sus destinos finales dependen de su localización en el embrión. Sin embargo, cuando se realizó el mismo experimento de trasplantes entre especies en una gástrula *tardía*, Spemann obtuvo resultados completamente diferentes. En

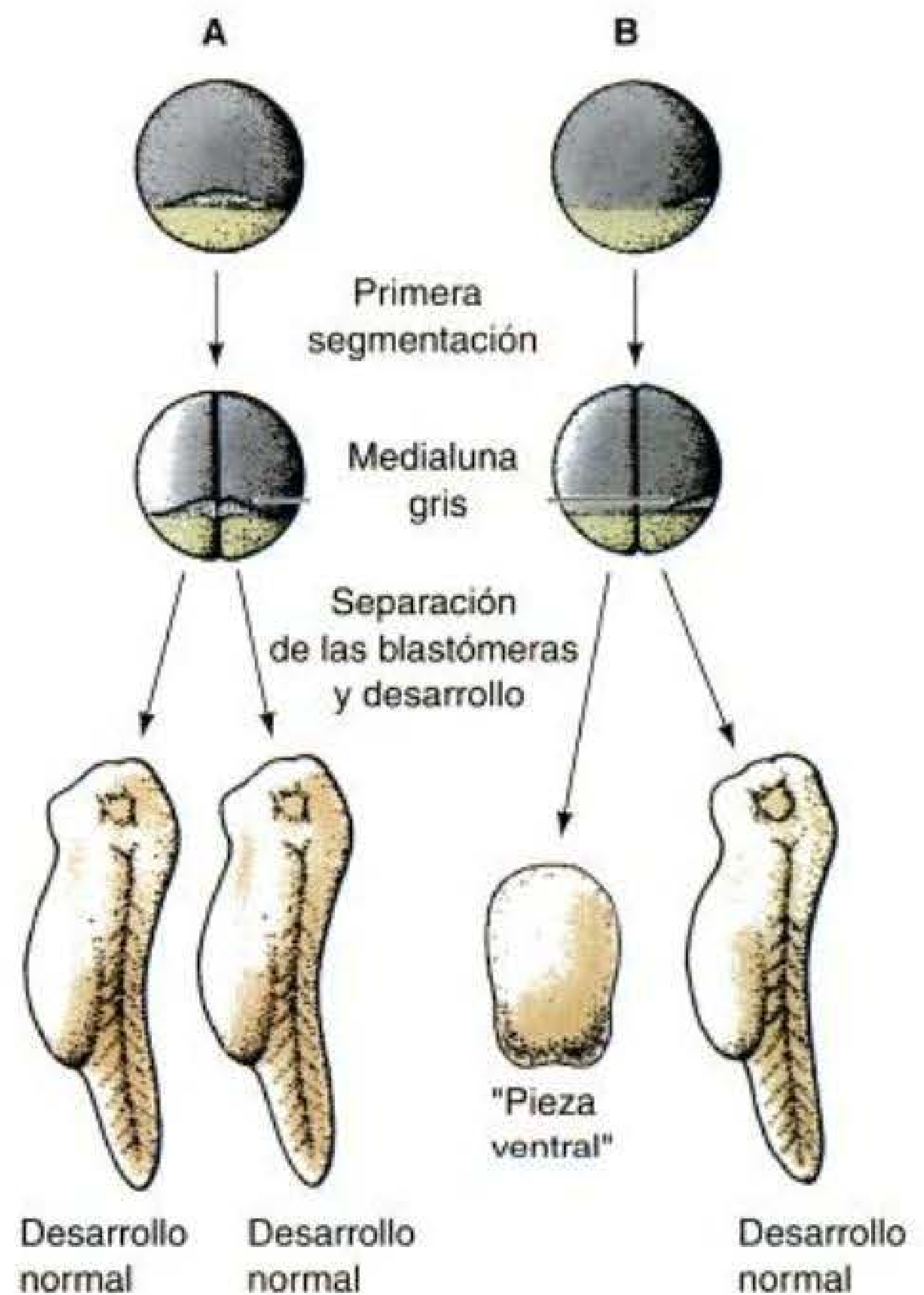


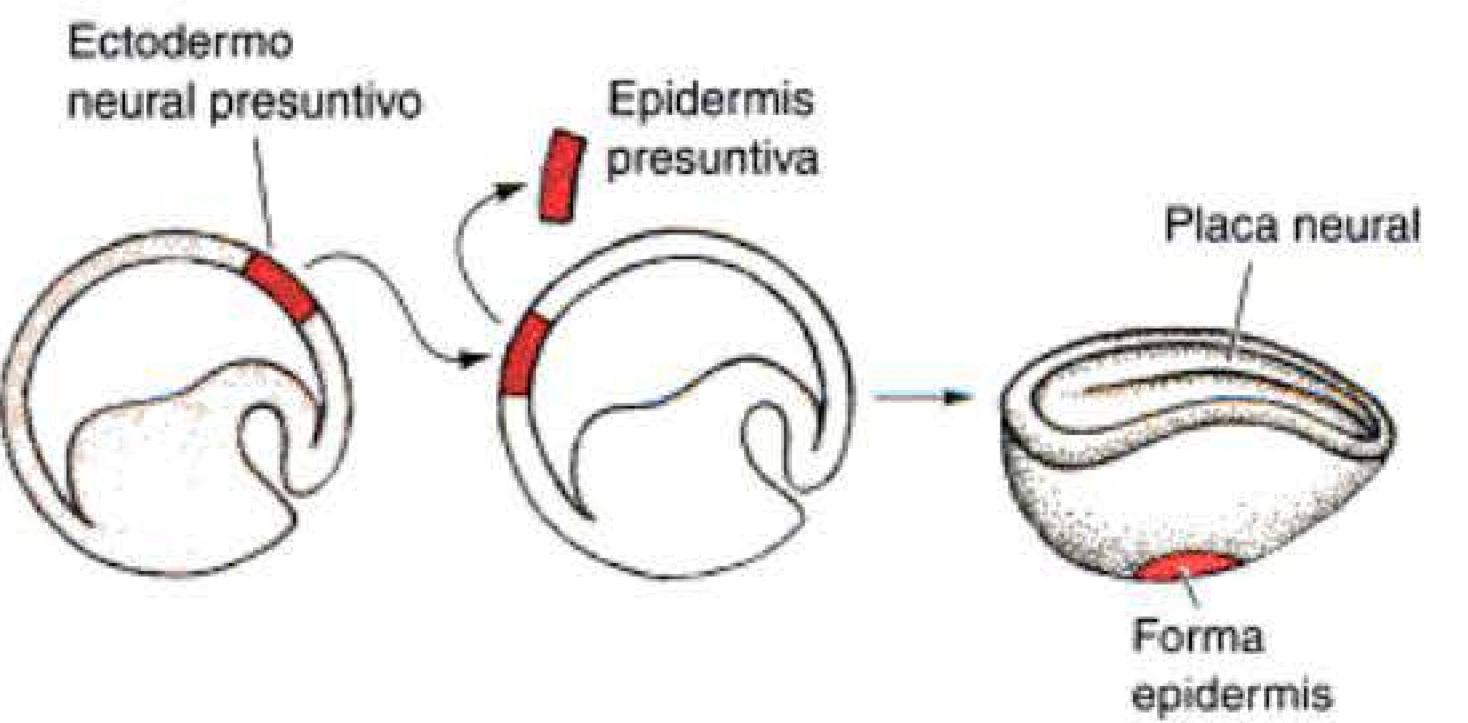
Fig. 10-19. Asimetría en los huevos de anfibios. **A.** Cuando el huevo (estadio de cigoto) es dividido a lo largo del plano de la primera segmentación en dos blastómeras, cada una de éstas se lleva una mitad de la medialuna gris, cada célula separada experimentalmente desarrolla un embrión normal. **B.** Cuando solo una de las dos blastómeras recibe la totalidad de la medialuna gris, ésta sola forma un embrión normal. La otra blastómera produce una masa de tejido desorganizado carente de estructuras dorsales. (Según Spemann 1938.)

Cuadro 10-1 *Resultados de los trasplantes de tejido durante los estadios de gástrula temprana y tardía en el tritón*

Región donante	*Región huésped*	*Diferenciación del tejido donante*	*Conclusión*
GÁSTRULA TEMPRANA			
Neuronas prospectivas	Epidermis prospectiva	Epidermis	Desarrollo dependiente (condicional)
Epidermis prospectiva	Neuronas prospectivas	Neuronas	Desarrollo dependiente (condicional)
GÁSTRULA TARDÍA			
Neuronas prospectivas	Epidermis prospectiva	Neuronas	Desarrollo independiente (autónomo) (determinado)
Epidermis propectiva	Neuronas prospectivas	Epidermis	Desarrollo independiente (autónomo) (determinado)

lugar de diferenciarse en relación a sus nuevas localizaciones, las células trasplantadas presentaban **desarrollo autónomo** (o **independiente**, o en **mosaico**). Sus destinos prospectivos estaban determinados y las células se desarrollaban con independencia de sus nuevas localizaciones embrionarias. Específicamente, las células neurales prospectivas ahora se desarrollaban en tejido nervioso incluso cuando eran colocadas en la región de la epidermis prospectiva y la epidermis prospectiva formaba piel aún en la región del tubo neural prospectivo. Dentro del tiempo que separa a la gastrulación en temprana y tardía, los potenciales de estos grupos de células llegan a ser restringidos a sus caminos finales de diferenciación. Algo estaba causando en ellas que sean comprometidas a destinos neural y epidérmico. ¿Qué estaba sucediendo?

A TRASPLANTE EN UNA GÁSTRULA TEMPRANA



B TRASPLANTE EN UNA GÁSTRULA TARDÍA

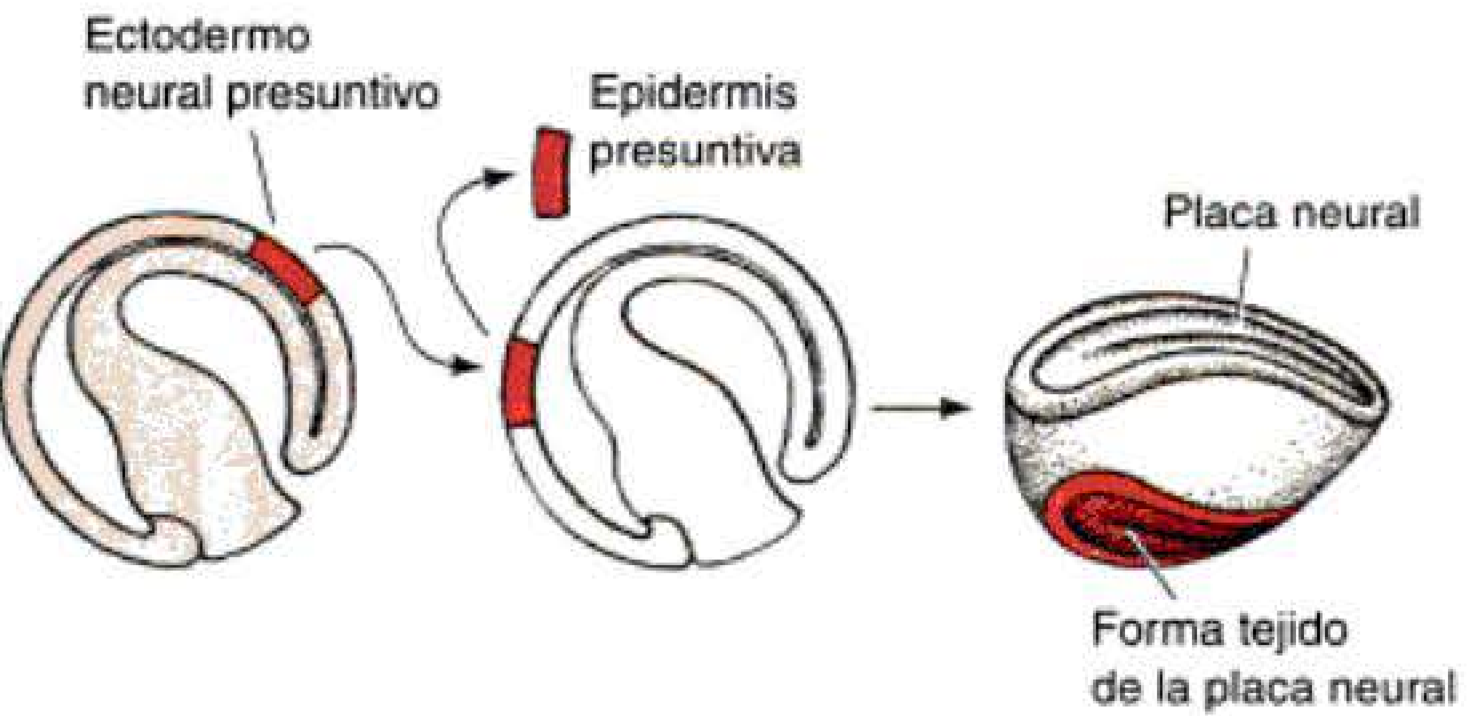


Fig. 10-20. Determinación del ectodermo durante la gastrulación del tritón. El ectodermo presuntivo de un embrión de tritón es trasplantado hacia una región de otro embrión que normalmente llega a ser epidermis. **A.** Cuando los tejidos son transferidos entre gástrulas tempranas, el tejido neural presuntivo se desarrolla hacia epidermis y solo es vista una placa neural. **B.** Cuando el mismo experimento es llevado a cabo con tejidos de gástrula tardía, las células neurales presuntivas forman tejido neural, haciendo de este modo que se formen dos placas neurales en el huésped. (Según Saxén y Toivonen 1962.)

Hans Spemann y Hilde Mangold: inducción embrionaria primaria

Los experimentos de trasplante más espectaculares fueron publicados por Hans Spemann y Hilde Mangold en 1924.* Ellos demostraron que de todos los tejidos en la gástrula temprana solo uno tenía su destino determinado. Este tejido autodiferenciante es el labio dorsal del blastoporo, el tejido derivado del citoplasma de la medialuna gris. Cuando este tejido del labio dorsal fue trasplantado hacia la región de piel ventral presuntiva de otra gástrula, no solo continuaba siendo labio del blastoporo, sino que además iniciaba la gastrulación y la embriogénesis en los tejidos de alrededor (fig. 10-21). ¡Se formaron dos embriones unidos en lugar de uno!

En estos experimentos, Spemann y Mangold utilizaron embriones de distintas pigmentaciones de dos especies de tritón –la de pigmentación oscura *Triturus taeniatus* y la no pigmentada *Triturus cristatus*– entonces cuando Spemann y Mangold prepararon estos trasplantes, fueron capaces de identificar los tejidos del huésped y los del

* Hilde Proescholdt Mangold murió en un trágico accidente en 1924, cuando el calentador de su cocina de gasolina explotó. En ese momento tenía 26 años y su estudio científico justo estaba siendo publicado. La suya es una de las muy pocas tesis doctorales en biología que han resultado directamente en la concesión de un premio Nobel. Para más información acerca de Hilde Mangold, su época y sus experimentos que identificaron al organizador, véase Hamburguer 1984, 1988 y Fässler y Sander 1996.

donante sobre las bases del color.* Cuando el labio dorsal de una gástrula temprana de *T. taeniatus* fue extirpado e implantado en la región de una gástrula temprana de *T. cristatus* destinada a ser epidermis ventral (piel del vientre), el tejido del labio dorsal se invaginaba justo como éste debía haberlo hecho normalmente (mostrando autodeterminación) y desaparecía por debajo de las células vegetales. El tejido donante pigmentado luego continuaba autodiferenciándose en cordamesodermo (notocorda) y otras estructuras del mesodermo que normalmente se forman del labio dorsal. A medida que las células mesodérmicas derivadas del nuevo donante se movían hacia delante, las células del huésped comenzaban a participar en la producción de un nuevo embrión, llegando a ser órganos que ellas normalmente nunca hubieran formado. En este embrión secundario, un somita podía verse conteniendo tejido pigmentado (donante) y sin pigmentar (huésped). Aún más espectacular, las células del labio dorsal fueron capaces de interactuar con los tejidos del huésped para formar una placa neural completa a partir del ectodermo del huésped. Por último, se formó un embrión secundario, frente a frente con su huésped. Los resultados de estos experimentos técnicamente difíciles han sido confirmados muchas veces (Capuron 1968; Smith y Slack 1983; Recanzone y Harris 1985).

> SITIO WEB 10.4 **Spemann, Mangold y el organizador (Spemann, Mangold, and the Organizer).** Spemann no vio la importancia de su trabajo la primera vez que él y Mangold lo hicieron. Este sitio web proporciona un relato más minucioso del porqué Spemann y Mangold realizaron este experimento.

Spemann (1938) se refirió a las células del labio dorsal y sus derivados (notocorda, mesodermo precordal) como el **organizador** debido a que 1) ellas inducían a los tejidos ventrales del huésped a cambiar sus destinos para formar un tubo neural y tejido mesodérmico dorsal (como somitas) y 2) ellos organizaban al huésped y a los tejidos donantes en un embrión secundario con nítidos ejes anteroposterior y dorsoventral. Él propuso que durante el desarrollo normal, estas células organizan al ectodermo dorsal en un tubo neural y transforman al mesodermo en torno a éste en el eje corporal anteroposterior. Ahora se sabe (gracias en gran parte a Spemann y sus estudiantes) que la interacción del cordamesodermo y del ectodermo no es suficiente para "organizar" al embrión en su totalidad. En su lugar, éste inicia una serie de acontecimientos inductivos secuenciales. Como se discutió en el capítulo 6, el proceso por el cual una región embrionaria interactúa con una segunda región para influenciar la diferenciación o comportamiento de esta segunda región se denomina inducción. Debido a que hay numerosas inducciones durante el desarrollo embrionario, esta inducción clave por medio de la cual la progenie de las células del labio dorsal inducen el eje dorsal y el tubo neural, es tradicionalmente denominada **inducción embrionaria primaria**.*

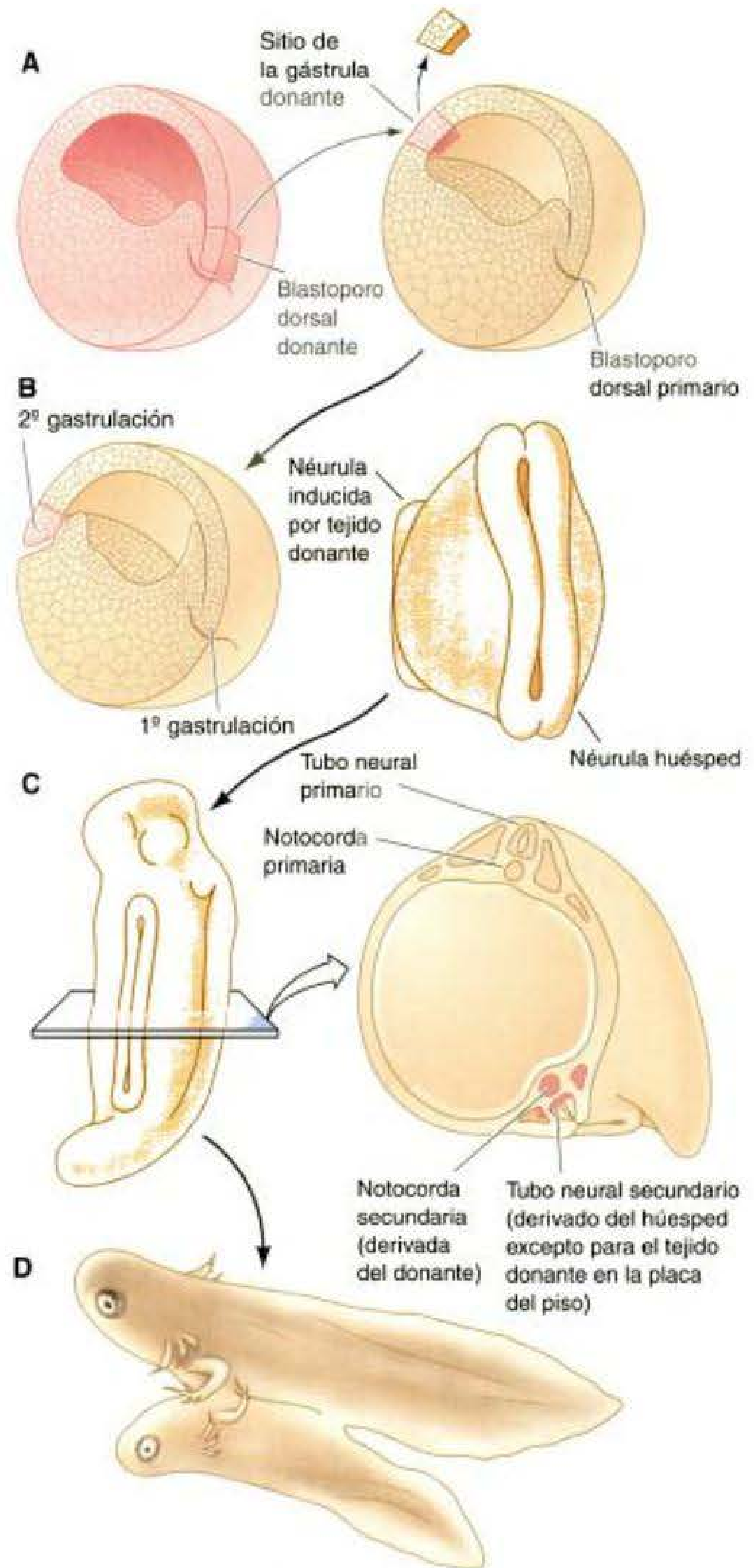


Fig. 10-21. Organización de un eje secundario por el tejido del labio dorsal del blastoporo. **A.** El tejido del labio dorsal de una gástrula temprana es trasplantado hacia otra gástrula temprana en la región que normalmente se convertirá en epidermis ventral. **B.** El tejido donante se invagina y forma un arquenterón secundario y luego un eje embrionario secundario. Los tejidos donantes y del huésped son vistos en el nuevo tubo neural, notocorda y somitas. **C.** Finalmente, se forma un segundo embrión que está unido a su huésped. (Según Hamburguer 1988.)

* *T. cristatus* es el tritón con cresta del norte y el *T. taeniatus* (también conocido como *T. vulgaris*) es el tritón común (o liso). Fue afortunado que el laboratorio de Spemann y sus estudiantes utilizaran con frecuencia embriones de salamandras para sus experimentos. El ectodermo de la rana es mucho más difícil de inducir que el de estos urodelos.

* Este término clásico ha sido una fuente de confusión debido a que la inducción del tubo neural por la notocorda no es considerado el primer proceso inductivo en el embrión. Se discutirán pronto acontecimientos inductivos que preceden a esta inducción "primaria".

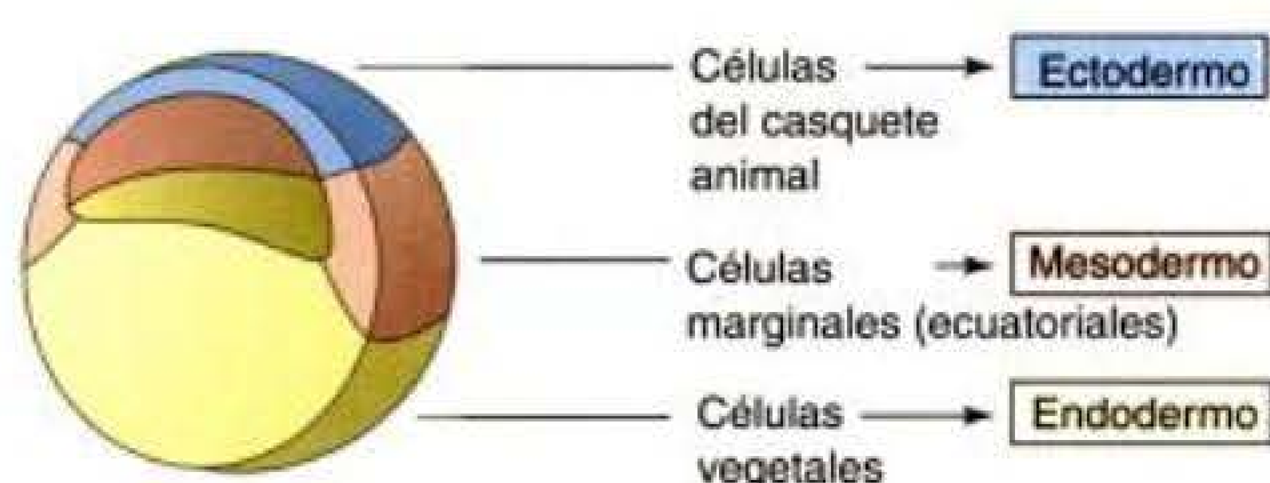
Mecanismos de la determinación del eje en los anfibios

Los experimentos de Spemann y Mangold demostraron que el labio dorsal del blastoporo, y el mesodermo dorsal y el endodermo faríngeo que se forman desde éste, constituyen un "organizador" que puede instruir la formación de nuevos ejes embrionarios. Pero los mecanismos por los cuales el organizador fue construido y a través de los cuales éste operaba se mantenían en un misterio. De hecho, se dice que la publicación científica de Spemann y Mangold planteó más preguntas que respuestas. Entre estas preguntas estaban:

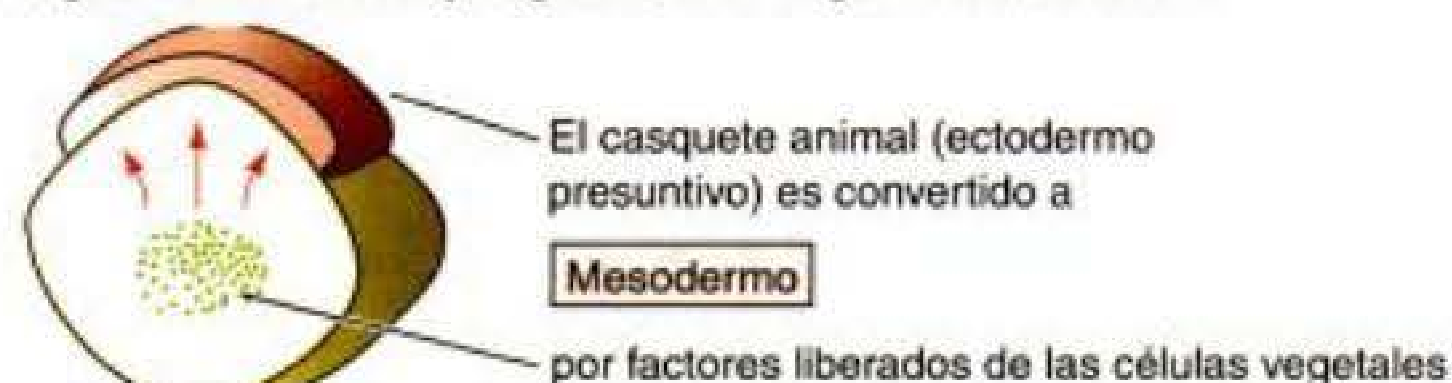
- ¿Cómo obtuvo el organizador sus propiedades? ¿Qué fue lo que provocó que el labio dorsal del blastoporo se diferenciara a partir de cualquier otra región del embrión?
- ¿Qué factores estaban siendo secretados desde el organizador para causar la formación del tubo neural y crear los ejes anteroposterior, dorsoventral e izquierda-derecha?
- ¿Cómo son establecidas las diferentes partes del tubo neural, con lo más anterior transformándose en los órganos sensoriales y en el cerebro anterior y lo más posterior transformándose en médula espinal?

Se tomará cada una de estas preguntas alternadamente.

A Fragmentos de blástula disecada dan origen a diferentes tejidos en cultivo:



B Fragmentos animales y vegetales dan origen al mesodermo



C

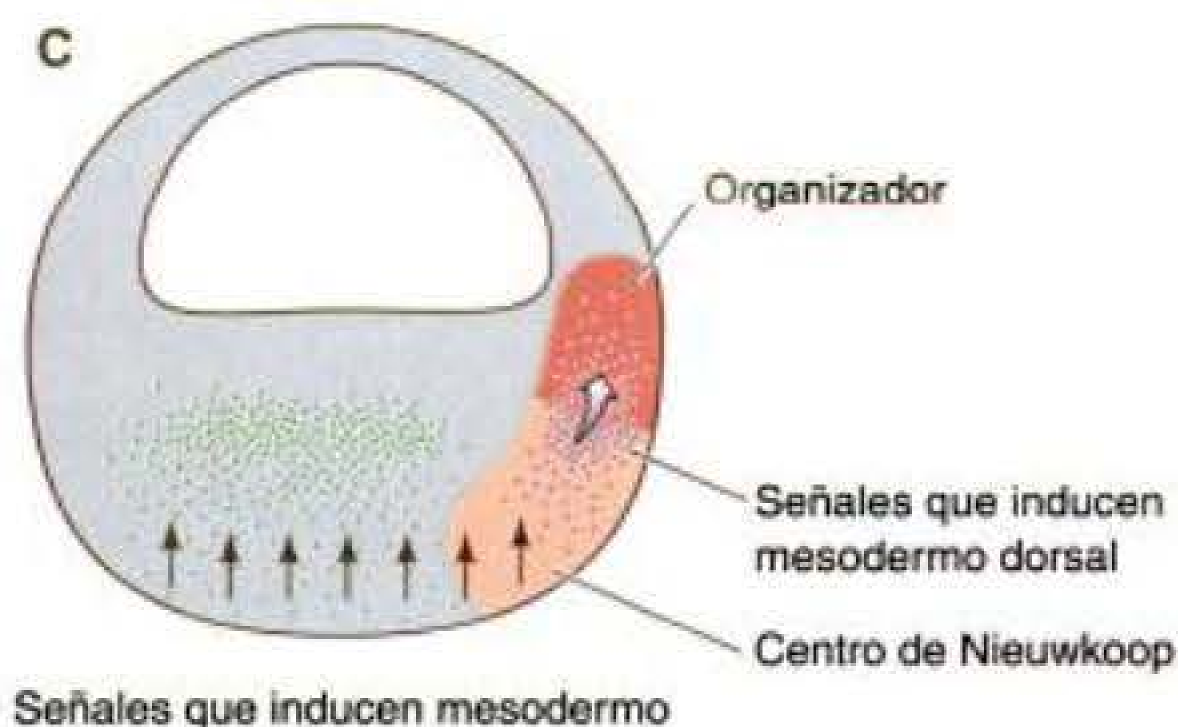


Fig. 10-22. Resumen de los experimentos de Nieuwkoop y de Nakamura y Takaski, que muestra la inducción mesodérmica por el endodermo vegetal. **A.** Las células del casquete animal aisladas se convierten en una masa de epidermis ciliada, las células vegetales aisladas generan tejido parecido al intestino y las células ecuatoriales aisladas (zona marginal) se convierten en mesodermo. **B.** Si las células del casquete animal son combinadas con las células del casquete vegetal, muchas de las células animales generan tejido mesodérmico. **C.** Modelo simplificado para la inducción del mesodermo en *Xenopus*. Una señal ventral (probablemente un complejo grupo de señales de factores TGF-β parecidos a la activina y de FGF) es liberada a lo largo de la región vegetal del embrión. Esta señal induce a las células marginales a convertirse en mesodermo. Sobre el lado dorsal (lejos del punto de entrada del espermatozoide), es liberada una señal por las células vegetales del centro de Nieuwkoop. Esta señal dorsal induce la formación del organizador de Spemann en las células marginales de la zona que recubren. La posible identidad de esta señal se explica más adelante en este capítulo. (C, según De Robertis y col. 1992.)

El origen del centro de Nieuwkoop

La clave principal en determinar cómo el labio dorsal del blastoporo obtuvo sus propiedades viene de los experimentos de Pieter Nieuwkoop (1969, 1973, 1977) y de Osama Nakamura. Nakamura y Takasaki (1970) demostraron que el mesodermo se origina de las células marginales (ecuatoriales) en el borde entre los polos animal y vegetal. Él y sus colegas en Holanda demostraron que las propiedades de su mesodermo recién formado eran inducidas por las células vegetales (endodermo presuntivo) subyacentes a ellas. Él extirpó las células ecuatoriales (es decir, mesodermo presuntivo) de una blástula y demostró que ni el casquete animal (ectodermo presuntivo) ni el casquete vegetal (endodermo presuntivo) produjeron tejido mesodérmico. Sin embargo, cuando los dos casquetes fueron recombinados, las células del casquete animal eran inducidas para formar estructuras mesodérmicas como la notocorda, los músculos, las células renales y las células sanguíneas (fig. 10-22). La polaridad de esta inducción (si las células animales formaban mesodermo dorsal o ventral) dependía de la polaridad dorsoventral del fragmento endodérmico (vegetal). Mientras que las células vegetales laterales y ventrales (aquellas cercanas al lado de entrada del espermatozoide) inducían mesodermo ventral (meséquima, sangre) y mesodermo intermedio (músculo, riñón), las células vegetales más dorsales especificaban componentes del mesodermo dorsal (somitas, notocorda), incluidos los que tienen propiedades de organizador. Estas células vegetales más dorsales de la blástula, que eran capaces de inducir el organizador, habían sido denominadas el **centro de Niewkoop** (Gerhart y col. 1989).

El centro de Niewkoop fue demostrado en el embrión de *Xenopus* de 32 células mediante experimentos de trasplante y recombinación. En primer lugar, Gimlich y Gerhart (Gimlich y Gerhart 1984; Gimlich 1985, 1986) llevaron a cabo un experimento análogo al de los estudios de Spemann y Mangold, excepto que ellos utilizaron blástula en lugar de gástrula. Cuando ellos trasplantaron las blastómeras vegetales más dorsales de una blástula hacia el lado vegetal ventral de otra blástula, se formaron dos ejes embrionarios (véase fig. 10-11B). En segundo lugar, Dale y Slack (1987) recombinaron a blastómeras vegetales individuales de un embrión de *Xenopus* de 32 células con el piso animal más superior de un embrión del mismo estadio marcado fluorescentemente. La célula vegetal más dorsal, como se esperaba, indujo a las células del polo animal a convertirse en mesodermo dorsal. Las cé-

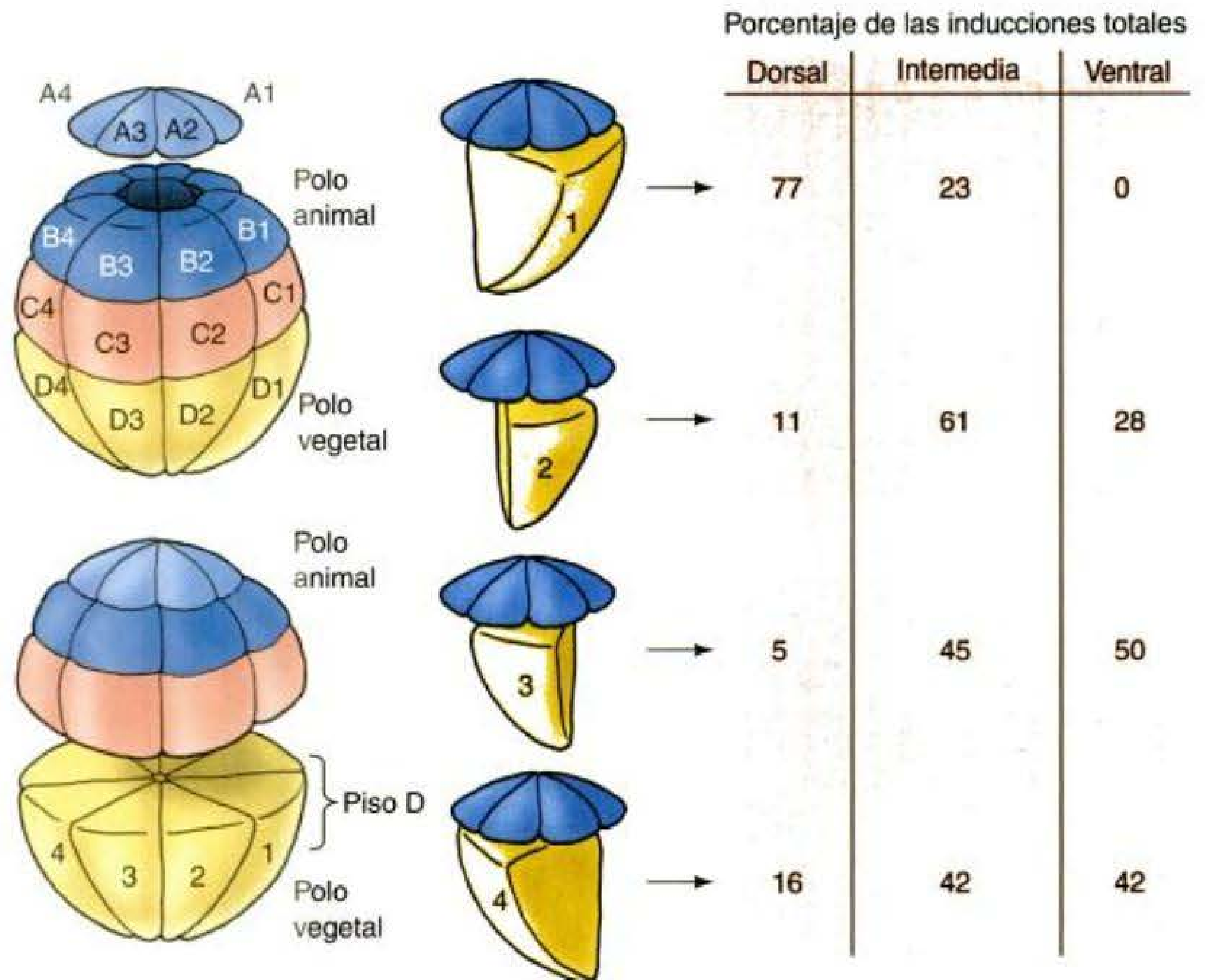


Fig. 10-23. La especificidad regional de la inducción del mesodermo puede demostrarse mediante la recombinación de blastómeras de embriones de *Xenopus* de 32 células. Las células del polo animal fueron marcadas con polímeros fluorescentes de modo que podían ser identificados sus descendientes y luego combinados con blastómeras vegetales individuales. Las inducciones que resultan de estas recombinaciones son resumidas a la derecha. D1, la blastómera vegetal más dorsal, fue la que más probablemente indujo a las células del polo animal a formar mesodermo dorsal. (Según Dale y Slack 1987.)

lulas vegetales restantes en general inducían a las células animales a producir tejido mesodérmico intermedio o ventral (fig. 10-23). Por lo tanto, las células vegetales dorsales pueden inducir a las células animales a convertirse en tejido mesodérmico dorsal.

El centro de Nieuwkoop es creado por la rotación citoplasmática que se produce durante la fecundación (véase cap. 7). Cuando esta rotación es inhibida por la luz UV, el embrión resultante no formará estructuras dorsales anteriores como la cabeza o el tubo neural (Vincent y Gerhart 1987). Sin embargo, estos embriones tratados con UV pueden ser rescatados mediante trasplante de las blastómeras vegetales más dorsales desde un embrión en estadio de 32 células (Dale y Slack 1987; véase fig. 10-11A). Si los huevos (cigotos) son rotados hacia el final del primer ciclo celular de modo tal que el futuro lado ventral está hacia arriba, se forman dos centros de Nieuwkoop, que llevan a la formación de dos labios dorsales del blastoporo y a dos ejes embrionarios (véase fig. 10-10). Por esta razón, la especificación del eje dorsoventral comienza en el momento de entrada del espermatozoide.

La biología molecular del centro de Nieuwkoop

En *Xenopus*, el endodermo es capaz de inducir la formación de mesodermo al hacer que las células del mesodermo presuntivo expresen el gen *Brachyury* (*Xbra*) de *Xenopus*. El mecanismo de inducción involucra la activación del gen *Xbra* por uno o más factores tipo activina (como las proteínas Vg1 y relacionada a Nodal) que son secretados por las células endodérmicas (Latinkic y col. 1997; Smith 2001). La proteína relacionada a Nodal **Derrière** es un candidato particularmente prometedor para un inductor de mesodermo, debido a que ésta es inducida por el factor de transcripción VegT que es encontrado en el endodermo y ésta puede inducir a las células del casquete animal a convertirse en mesodermo al considerar las distancias de largo alcance predichas por los experimentos de Nieuwkoop (véase fig. 10-22; White y col. 2002). Como se vio en el capítulo 3, el gen *Xbra* es transcrito cuando está presente una concentración particular de esta proteína. Una vez que es expresada, la proteína Xbra actúa como un factor de transcripción para inducir a eFGF, un factor paracrino que mantiene la expresión de *Xbra*. Esto mantiene al gen *Xbra* activo más tiempo luego de que han cesado las señales que han iniciado su transcripción. La proteína Xbra también activa a los genes que producen proteínas específicas del mesodermo.

Mientras que todas las células vegetales parecen ser capaces de inducir a las células marginales que recubren para llegar a ser mesodermo (y expresar *Xbra*), solamente las células vegetales más dorsales pueden instruir a las células marginales que recubren para que se conviertan en el organizador. El principal candidato para el factor que forma el centro de Nieuwkoop en estas células vegetales más dorsales es la **β-catenina**. La β-catenina es una proteína multifuncional que puede actuar como un anclaje para las cadherinas de la membrana celular (véase cap. 3) o como un factor de transcripción nuclear (véase cap. 6). En los embriones de *Xenopus*, la β-catenina comienza a acumularse en la región dorsal del cigoto durante los movimientos citoplasmáticos de la fecundación. La β-catenina continúa acumulándose preferencialmente en el lado dorsal durante la segmentación temprana y su acumulación es vista en los núcleos de las células dorsales (fig. 10-24A-D; Schneider y col. 1996; Larabell y col. 1997). Esta región de acumulación de la β-catenina originalmente parece cubrir al centro de Nieuwkoop y a las regiones organizadoras. Durante la segmentación tardía, las células que contienen altos niveles de β-catenina pueden residir específicamente en el centro de Nieuwkoop (Heasman y col. 1994a; Guger y Gumbiner 1995).

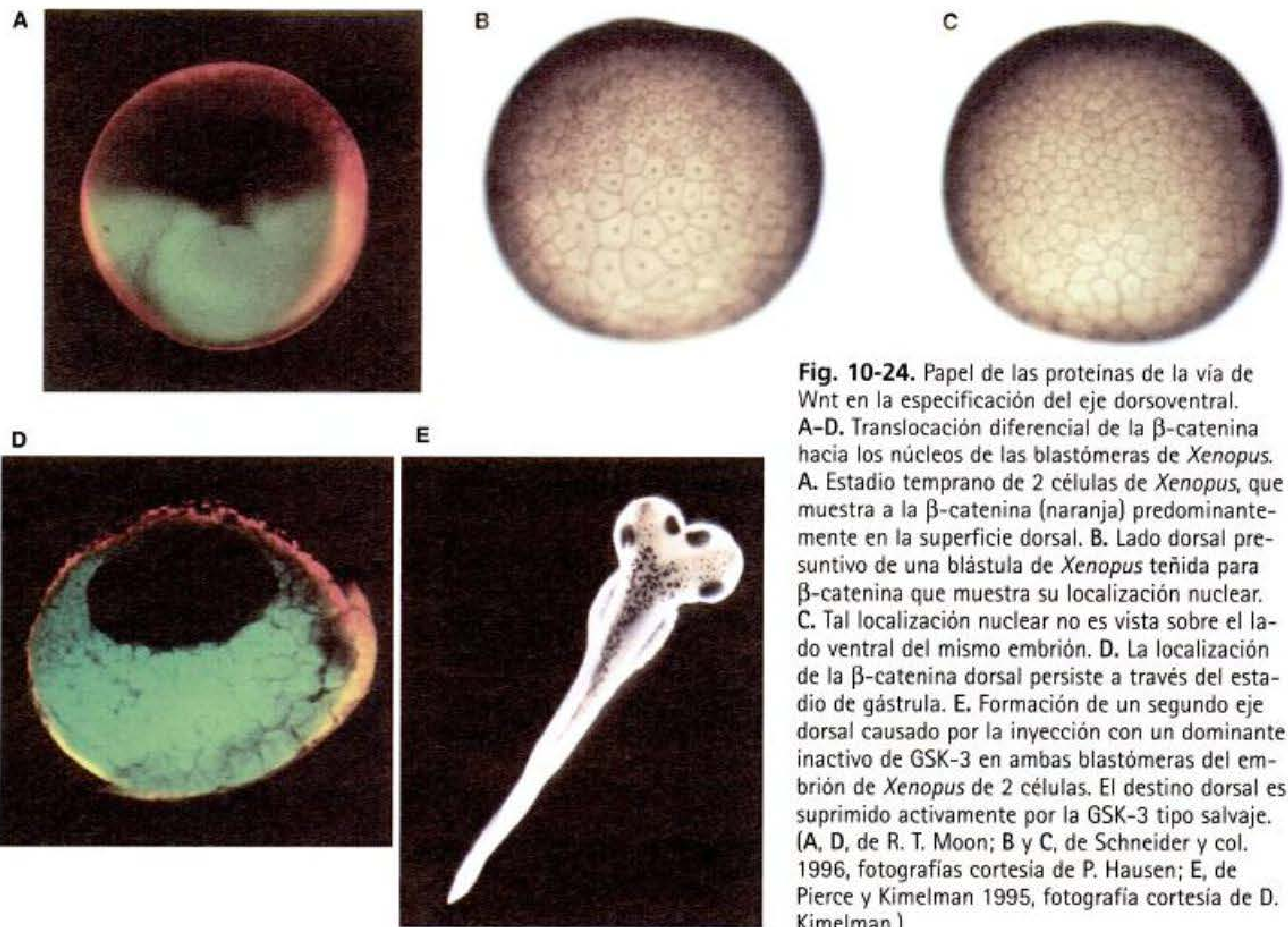


Fig. 10-24. Papel de las proteínas de la vía de Wnt en la especificación del eje dorsoventral. **A-D.** Translocación diferencial de la β-catenina hacia los núcleos de las blastómeras de *Xenopus*. **A.** Estadio temprano de 2 células de *Xenopus*, que muestra a la β-catenina (naranja) predominantemente en la superficie dorsal. **B.** Lado dorsal presuntivo de una blástula de *Xenopus* teñida para β-catenina que muestra su localización nuclear. **C.** Tal localización nuclear no es vista sobre el lado ventral del mismo embrión. **D.** La localización de la β-catenina dorsal persiste a través del estadio de gástrula. **E.** Formación de un segundo eje dorsal causado por la inyección con un dominante inactivo de GSK-3 en ambas blastómeras del embrión de *Xenopus* de 2 células. El destino dorsal es suprimido activamente por la GSK-3 tipo salvaje. (**A**, **D**, de R. T. Moon; **B** y **C**, de Schneider y col. 1996, fotografías cortesía de P. Hausen; **E**, de Pierce y Kimelman 1995, fotografía cortesía de D. Kimelman.)

SITIO WEB 10.5 **Inducción del mesodermo (Mesoderm induction).** Hay numerosas teorías con respecto a cómo el mesodermo genérico es inducido por el endodermo. La evidencia señala a tres moléculas como posibles inductores mesodérmicos: bFGF, Vg1 y una proteína tipo activina. Estas proteínas pueden activar a *Xbra* así como a otras proteínas mesodérmicas.

β-catenina es un elemento clave en la formación del eje dorsal y la disminución experimental de los transcritos de β-catenina con oligonucleótidos antisentido da como resultado la carencia de estructuras dorsales (Heasaman y col. 1994a). Además, la inyección de β-catenina exógena en el lado ventral de un embrión produce un eje secundario (Funayama y col. 1995; Guger y Gumbiner 1995). La β-catenina es parte de la vía de la transducción de la señal de Wnt y es regulada negativamente por la glucógeno sintetasa cinasa 3 (GSK-3; véase cap. 6). GSK-3 también juega un papel crítico en la formación del eje mediante la supresión de los destinos dorsales. GSK-3 activada bloquea la formación del eje cuando se agrega al huevo (Pierce y Kimelman 1995; He y col. 1995; Yost y col. 1996). Si la GSK-3 endógena es noqueada por una proteína dominante negativa en las células ventrales del embrión temprano, se forma un segundo eje (fig. 10-24E).

Entonces ¿cómo llega a ser localizada la β-catenina en las futuras células dorsales de la blástula? Experimentos de marcación (Yost y col. 1996; Larabell y col. 1997) sugieren que la β-catenina es sintetizada inicialmente (desde mensajeros maternos) en todo el embrión, pero es degradada específicamente en las células ventrales por la fosforilación mediada por GSK-3. El acontecimiento crítico para la determinación del eje puede ser el movimiento de un inhibidor de GSK-3 hacia el citoplasma opuesto al punto de entrada del espermatozoide (es decir, hacia las futuras células dorsales). Un candidato para este agente es la proteína Disheveled. Esta proteína es el supresor normal de GSK-3 en la vía de Wnt (véase fig. 6-24) y se la encuentra originalmente en la corteza vegetal de los ovocitos de *Xenopus* sin fecundar. Sin embargo, en el momento de la fecundación, Disheveled es translocada a lo largo de las matrices microtubulares hacia el lado dorsal del embrión (fig. 10-25; Milleer y col. 1999). Por lo tanto, sobre el lado dorsal del embrión, β-catenina debería ser estable, debido a que GSK-3 no es capaz de degradarla; mientras que en la porción ventral del embrión, GSK-3 debe iniciar la degradación de la β-catenina.

SITIO WEB 10.6 **GBP (GBP).** Además de Disheveled, un segundo inhibidor de GSK-3 ha sido identificado en los huevos de *Xenopus*. Esta proteína, GBP, puede rescatar la formación del eje en huevos tratados con UV.

β-catenina es un factor de transcripción que puede asociarse con otros factores de transcripción para darles nuevas propiedades. Se sabe que la β-catenina de *Xenopus*

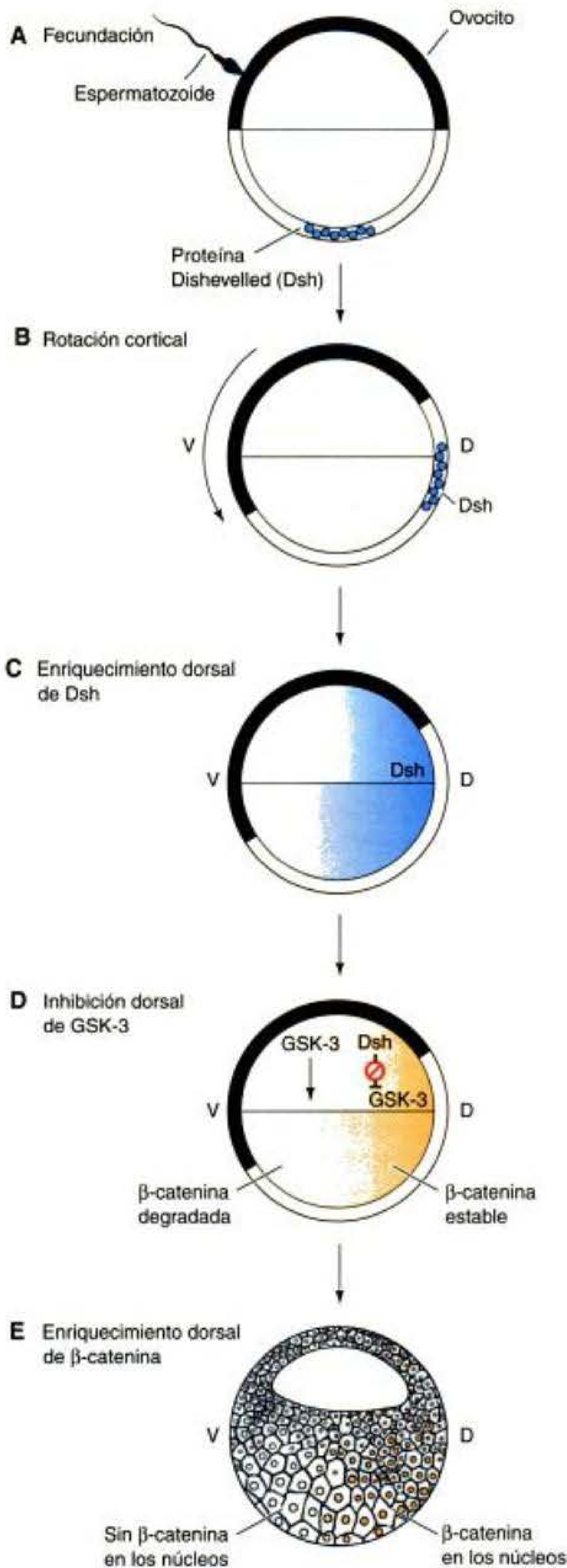


Fig. 10-25. Modelo del mecanismo por el cual la proteína Disheveled estabiliza a la β-catenina en la porción dorsal del huevo (cigoto) de anfibio. **A.** Disheveled (Dsh) se asocia en el polo vegetal de un ovocito sin fecundar con un grupo particular de proteínas. **B.** En el momento de la fecundación, estas vesículas proteicas son translocadas dorsalmente a lo largo de los senderos de los microtúbulos subcorticales. **C.** Luego Disheveled es liberada de sus vesículas y es distribuida en el futuro tercio dorsal del embrión de una célula (cigoto). **D.** Disheveled se une a GSK-3, bloquea su acción y evita de este modo la degradación de la β-catenina sobre el lado dorsal del embrión. **E.** Los núcleos de las blastómeras en la región dorsal del embrión reciben β-catenina, mientras que los núcleos de las de la región ventral no lo hacen.

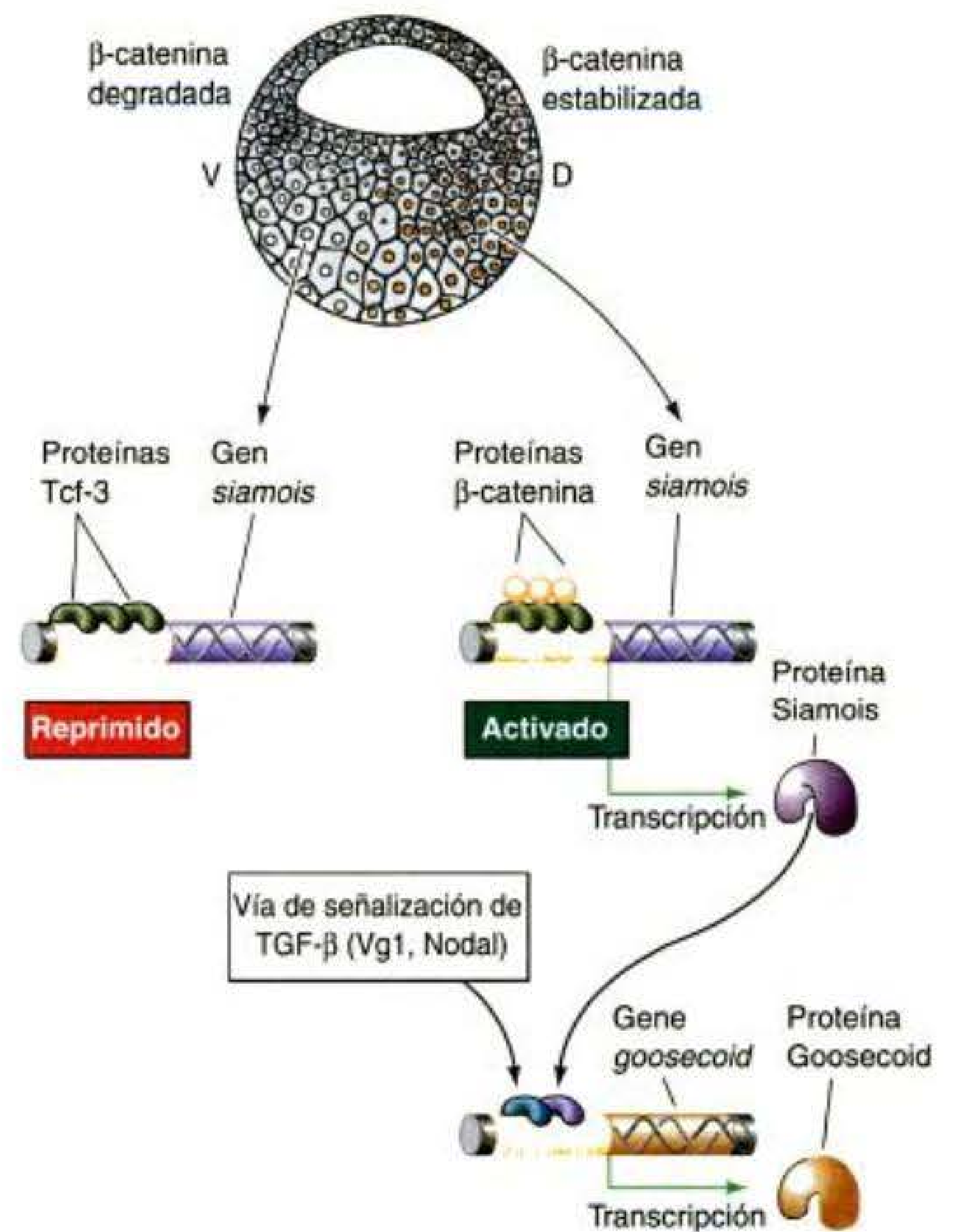


Fig. 10-26. Resumen de los acontecimientos hipotéticos para producir la inducción del organizador en el mesodermo dorsal. La rotación cortical causa la translocación de la proteína Disheveled hacia el lado dorsal del embrión. Dsh se une a GSK-3, permitiendo de este modo que la β-catenina se acumule en la futura porción dorsal del embrión. Durante la segmentación, la β-catenina ingresa en los núcleos y se une a Tcf3 para formar un factor de transcripción que activa a los genes que codifican proteínas como Siamois. Siamois y Xlim1, un factor de transcripción activado por la vía de TGF-β, funcionan juntos para activar al gen *goosecoid* en el organizador. Goosecoid es un factor de transcripción que puede activar a genes cuyas proteínas son responsables de las actividades del organizador. (Según Moon y Kimelman 1998).

puede combinarse con un factor de transcripción ubicuo conocido como **Tcf3** y que una forma mutante de Tcf3 carente del dominio de unión de β-catenina resulta en embriones sin ejes dorsales (Molenaar y col. 1996). El complejo β-catenina/Tcf3 parece unirse a los promotores de varios genes cuya actividad es crítica para la formación del eje. Uno de estos genes es *siamois*. Este gen codifica un factor de transcripción homeodominio y es expresado en el centro de Nieuwkoop inmediatamente después de la transición de blástula media. Si este gen es expresado ectópicamente en las células vegetales ventrales, emerge un eje secundario sobre el antiguo lado ventral del embrión y si se evita la rotación cortical, se elimina la expresión de *siamois* (Lemaire y col. 1995; Brannon y Kimelman 1996). Se piensa que la proteína Tcf3 inhibe la transcripción de *siamois* cuando ésta se une a los promotores del gen ante la ausencia de β-catenina. Sin embargo, cuando el complejo Tcf3/β-catenina se une a su promotor, *siamois* es activado (fig. 10-26; Brannon y col. 1997).

La proteína Siamois es crítica para la expresión de genes específicos del organizador (Fan y Sokol 1997; Kessler 1997). La proteína Siamois se une y activa a los promotores de varios genes involucrados en las funciones de organizador. Éstos incluyen a genes que codifican los factores de transcripción Goosecoid y Xlim1 y a los factores paracrinos Cerberus y Frzb (Laurent y col. 1997; Engleka y Kessler 2001). Goosecoid parece ser esencial para activar a numerosos genes en el organizador. Entonces uno podría esperar que si el lado dorsal del embrión contenía β-catenina, esta β-catenina podría permitir a esta región expresar Siamois y que Siamois iniciara la formación del organizador. Sin embargo, Siamois solo no es suficiente para generar el organizador; otra proteína también parece ser crítica en la activación de *goosecoid* y en la formación del organizador. Estudios recientes sugieren que la máxima expresión de *goosecoid* se produce cuando hay un sinergismo entre la proteína Siamois y una señal de TGF-β expresada vegetalmente (véase cap. 6; Brannon y Kimelman 1996; Engleka y Kessler 2001). Mientras que la rotación cortical puede activar a las β-cateninas y permitir la expresión de *siamois* en la región dorsal del embrión, la traducción de los mensajeros localizados vegetalmente que codifican factores paracrinos de la familia de TGF-β puede generar una proteína que estimula la mayor activación de *goosecoid* en las células que se convertirán en el organizador. Una proteína de la familia TGF-β en el centro de Nieuwkoop podría inducir a las células en la zona marginal dorsal por arriba de ellas a expresar algunos factores de transcripción que también se unirían al promotor del gen *goosecoid* y cooperarían con Siamois para activarlo (véase fig. 10-26).

Los candidatos para este factor TGF-β incluyen a las proteínas Vg1 y a la relacionada con nodal de *Xenopus*. Cada una de estas proteínas es producida en el endodermo (véase fig. 5-34). Agius y col. (2000) han proporcionado evidencia de que todas estas proteínas pueden actuar en una vía y que las proteínas críticas son los factores relacionados con Nodal. Cuando ellos repitieron los experimentos de recombinación animal-vegetal de Nieuwkoop (véase fig. 10-22) pero incluyeron un inhibidor específico de las proteínas relacionadas con Nodal, la inducción por las células vegetales no se producía. (El inhibidor no inhibió a Vg1, VegT o activina.) Además, encontraron que durante los estadios de blástula tardía, varias proteínas relacionadas con Nodal (incluidas Xnr1, Xnr2 y Xnr4) son expresadas en un gradiente dorsal-hacia-ventral en el endodermo. Este gradiente es formado por la activación de la expresión del gen relacionado con Nodal de *Xenopus* mediante la acción sinérgica de VegT y Veg1 con β-catenina. Agius y col. presentaron un modelo, mostrado en la figura 10-27, en el cual la β-catenina localizada dorsalmente y las señales Vg1 localizadas vegetalmente interactúan para crear un gradiente a través del endodermo de las proteínas relacionadas con Nodal (Xnr1, 2, 4). Estas proteínas especifican el mesodermo de modo tal que las regiones con poca proteína relacionada a Nodal llegan a ser mesodermo ventral, las regiones con alguna proteína relacionada a Nodal se convierten en mesodermo lateral y las regiones con una gran cantidad de proteína relacionada a Nodal se convierten en el organizador.

Las funciones del organizador

Mientras que las células del centro de Nieuwkoop se mantienen como endodérmicas, las células del organizador se convierten en mesodermo dorsal y migran por debajo del ectodermo dorsal. Allí, el mesodermo dorsal induce la formación del sistema nervioso central. Las propiedades del tejido organizador pueden dividirse en cuatro funciones principales.

1. La capacidad de autodiferenciar mesodermo dorsal (placa precordal, cordamesodermo, etc.).
2. La capacidad para dorsalizar al mesodermo circundante hacia mesodermo paraxial (formador de somitas) (cuando esto formaría por otra parte el mesodermo ventral).
3. La capacidad para dorsalizar al ectodermo, al inducir la formación del tubo neural.
4. La capacidad para iniciar los movimientos de la gastrulación.

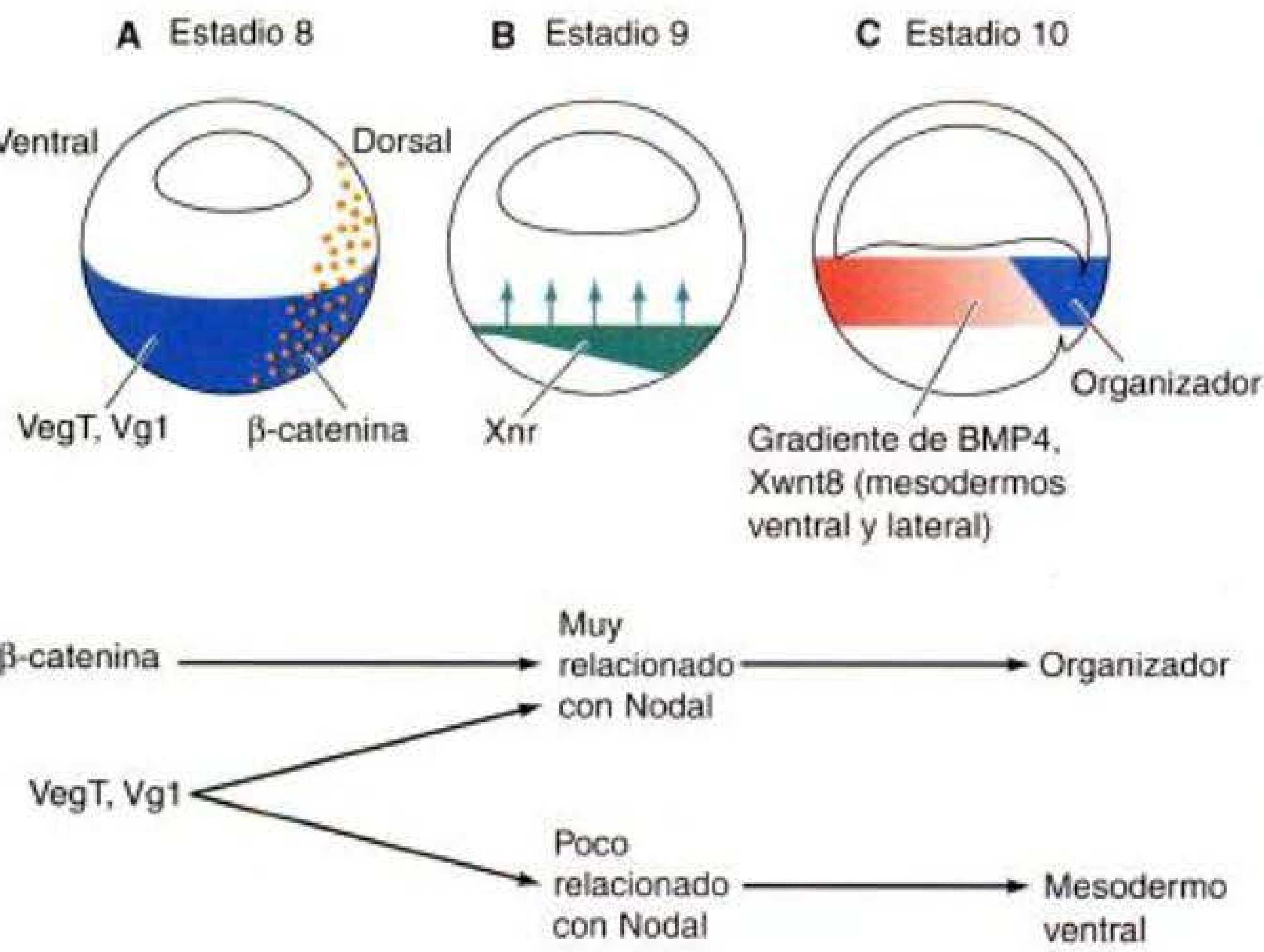


Fig. 10-27. Modelo para la inducción del mesodermo y la formación del organizador mediante la interacción de las proteínas β-catenina y TGF-β. **A.** En los estadios de blástula tardía, Vg1 y VegT se encuentran en el hemisferio vegetal, mientras que la β-catenina se localiza en la región dorsal. **B.** β-catenina actúa sinérgicamente con Veg1 y VegT para activar a los genes relacionados con Nodal (*Xnr*) de *Xenopus*. Esto crea un gradiente de proteínas Xnr a través del endodermo, más elevado en la región dorsal. **C.** El mesodermo es especificado por el gradiente de las proteínas Xnr. Las regiones mesodérmicas con poca proteína Xnr o sin ella tienen altos niveles de BMP4 y de Xwnt8 y se convierten en mesodermo ventral. Las que tienen concentraciones intermedias de Xnrs se convierten en mesodermo lateral. Donde hay altas concentraciones de Xnrs, el gen *goosecoid* y otros genes mesodérmicos dorsales son activados y el tejido mesodérmico se transforma en el organizador. (Estos resultados pueden explicar los experimentos de concentración de actividad mencionados en el cap. 3.) (Según Agius y col. 2000.)

En *Xenopus* (y en otros vertebrados), la formación del eje anteroposterior sigue a la formación del eje dorsoventral. Una vez que la porción dorsal del embrión es establecida, los movimientos de involución del mesodermo establecen el eje anteroposterior. El mesodermo que migra primero a través del labio dorsal del blastoporo da origen a las estructuras anteriores; el mesodermo en migración a través de los labios lateral y ventral forma las estructuras posteriores.

Ahora se piensa que las células del organizador contribuyen finalmente a cuatro tipos celulares –endodermo faríngeo, mesodermo de la cabeza (placa precordal), mesodermo dorsal (primariamente la notocorda) y el labio dorsal del blastoporo (Keller 1976; Gont y col. 1993). El endodermo faríngeo y la placa precordal conducen la migración del tejido organizador y parecen inducir al cerebro anterior y al cerebro medio. El mesodermo dorsal induce la formación del cerebro posterior (rombencéfalo) y del tronco. El labio dorsal del blastoporo forma el mesodermo dorsal y finalmente se convierte en la bisagra cordaneural que induce el extremo de la cola.

La primera descripción del organizador dio comienzo a uno de los primeros programas de investigación científica verdaderamente internacionales: la búsqueda de las moléculas del organizador. Investigadores de Gran Bretaña, Alemania, Francia, Estados Unidos, Bélgica, Finlandia, Japón y de la Unión Soviética trataron de hallar estas sustancias destacables (véase Gilbert y Saxén 1993). R. G. Harrison (citado por Twitty 1966, p. 39) se refirió a la gástrula de anfibios como el "nuevo Yukon por el que mineros entusiastas ahora están apurándose a cavar por el oro alrededor del blastoporo." Lamentablemente, sus picos y palas probaron ser demasiado desafilados para sacar a la luz las moléculas involucradas. Estas proteínas responsables de la inducción estaban presentes en concentraciones demasiado pequeñas para análisis bioquímicos y las grandes cantidades de vitelo y de lípidos en los huevos de anfibio interferían con la purificación proteica (Grunz 1997). El análisis de las moléculas del organizador tuvo que esperar hasta las tecnologías de DNA recombinante que permitieron a los investigadores producir clones de cDNA a partir del mRNA del labio del blastoporo y ver cuáles de estos clones codificaban factores que podían dorsalizar al embrión.

SITIO WEB 10.7 **Intentos tempranos para localizar a las moléculas del organizador (Early attemps to locate the organizer molecules).** Mientras que Spemann no creía que las moléculas solas podían organizar al embrión, sus estudiantes comenzaron una larga búsqueda de estos factores.

La formación del mesodermo dorsal (organizador) involucra la activación de varios genes. Las proteínas secretadas por el centro de Nieuwkoop se piensa que activan a un grupo de factores de transcripción en las células mesodérmicas por arriba de éstas. Los factores de transcripción luego activan a los genes que codifican los productos secretados del organizador. Se han encontrado varios factores de transcripción específicos del organizador y se enumeran en el cuadro 10-2.

Como se mencionó antes, uno de los blancos de interés más importantes del centro de Nieuwkoop parece ser el gen *goosecoid*. El área de expresión del mRNA de *goosecoid* se correlaciona con el dominio del organizador en los animales normales y en los tratados experimentalmente. Cuando el tratamiento con cloruro de litio es utilizado para incrementar al mesodermo del organizador en toda la zona marginal, la expresión de *goosecoid* es expandida del mismo modo. Por el contrario, cuando los cigotos son tratados con luz UV antes de su primera segmentación, la inducción dorsal-anterior y la expresión de *goosecoid* están significativamente inhibidas. La inyección de la longitud total del mensajero de *goosecoid* en las dos blastómeras ventrales del embrión de *Xenopus* de 4 células hace que la progenie de aquellas blastómeras involucione, experimentan extensión convergente y forman el mesodermo dorsal y el endodermo de la cabeza de un eje secundario (fig.10-28; Niehrs y col. 1993). Los experimentos de marcación (Niehrs y col. 1993) han demostrado que las células inyectadas con *goosecoid* son capaces de reclutar a las células huéspedes vecinas en el eje dorsal también. Por lo tanto, el centro de Nieuwkoop activa al gen *goosecoid* en los tejidos del organizador y este gen codifica una proteína de unión al DNA que: 1) activa las propiedades de migración (involución y extensión convergente) de las células del labio dorsal del blastoporo, 2) determina autónomamente los destinos del mesodermo dorsal de las células que lo expresan y 3) permite a las células que expresan *goosecoid* reclutar a las células vecinas en el eje dorsal. Se ha visto también que Goosecoid activa a *Otx2*, un gen que es crítico para la formación del cerebro, en el mesodermo anterior y en el ectodermo del cerebro presuntivo (Blitz y Cho 1995).

Cuadro 10-2 *Proteínas expresadas en forma única o casi exclusiva en el organizador (lista parcial)*

Proteínas nucleares	*Proteínas secretadas*
Xlim1	Cordina
Xnot	Dickkopf
Otx2	ADMP
XFD1	Frzb
XANF1	Nogina
Goosecoid	Folistatina
HNF3β	Sonic hedgehog
	Cerberus
	Proteínas relacionadas con Nodal (varias)

Las proteínas difusibles del organizador I: los inhibidores de BMP

La proteína Goosecoid funciona en el núcleo, debe activar (de manera directa o indirecta) los genes que codifican proteínas solubles que funcionan para organizar a los ejes dorsoventral y anteroposterior. La evidencia inicial de que estas señales se difunden desde la notocorda viene de varias fuentes. En primer lugar, Hans Holtfreter (1933) demostró que si los embriones de anfibio eran colocados en solución salina concentrada, el mesodermo se evaginará en lugar de invaginarse y no se encontrará sub-

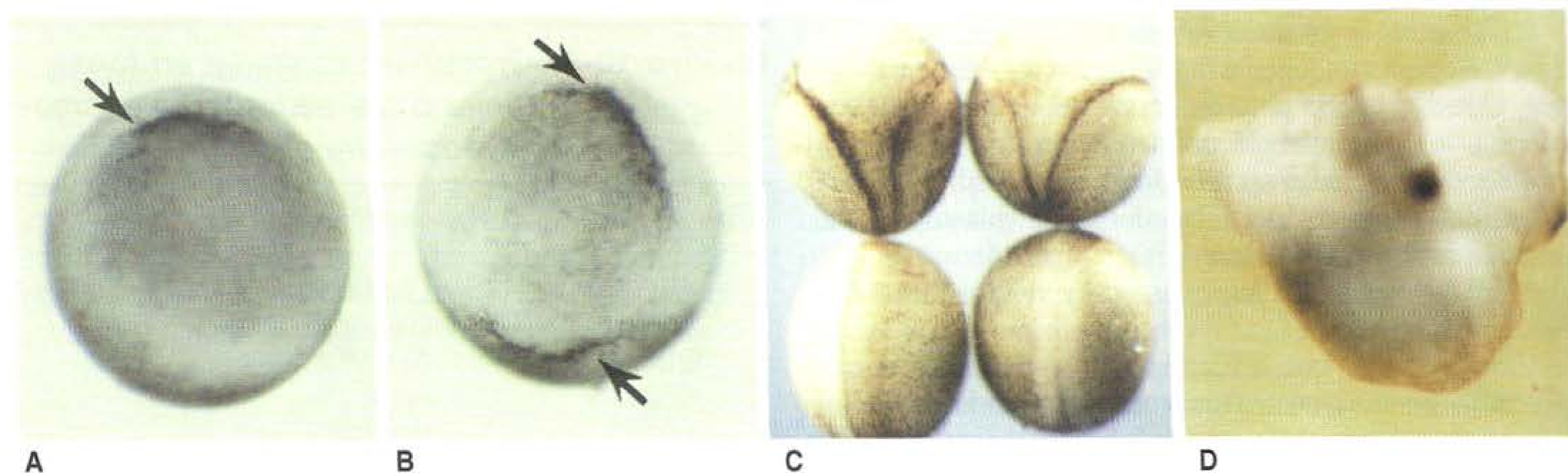


Fig. 10-28. Capacidad del mRNA de *goosecoid* para inducir un nuevo eje. **A.** En el estadio de gástrula, un embrión control (sin inyectar o al que se le dio una inyección del mRNA parecido a *goosecoid* pero carente de homeobox) tiene un labio dorsal del blastoporo (flecha). **B.** Embrión cuyas blastómeras vegetales ventrales fueron inyectadas en el estadio de 16 células con el mensajero de *goosecoid*. Obsérvese el labio dorsal secundario. **C.** Los dos embriones de arriba, que fueron inyectados con mRNA de *goosecoid*, muestran dos ejes dorsales; los dos embriones control de abajo no lo muestran. **D.** Embriones gemelos unidos producidos mediante la inyección de *goosecoid*. Han sido inducidos dos grupos completos de estructuras de la cabeza. (Según Cho y col. 1991a; Niehrs y col. 1993; fotografías cortesía de E. De Robertis.)

yacente al ectodermo. En estos casos, el ectodermo no tiene a la notocorda por debajo y ésta no forma estructuras neurales. Evidencia posterior para los factores solubles surgió a partir de estudios de transferencia a filtros realizados por investigadores finlandeses (Saxén 1961; Toivonen y col. 1975; Toivonen y Wartiovaara 1976). El tejido del labio dorsal del tritón fue colocado sobre un lado de un filtro suficientemente delgado de modo tal que ningún proceso pudiera pasar a través de los poros y el ectodermo de la gástrula competente fue colocado sobre el otro lado. Después de varias horas, fueron observadas estructuras neurales en el tejido ectodérmico (fig. 10-29). Sin embargo, tomó otro cuarto de siglo identificar las identidades de los factores que difunden desde el organizador.

Estudios recientes sobre inducción han resultado en una conclusión destacable y para nada obvia: el ectodermo es en realidad inducido a convertirse en epidérmico. Los agentes de esta inducción son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP). El sistema nervioso se forma desde la región de ectodermo que es protegida de esta inducción epidérmica (Hemmati-Brivanlou y Melton 1997). En otras palabras, 1) el "destino por defecto" (*default fate*) del ectodermo es llegar a convertirse en tejido neural; 2) ciertas partes del embrión inducen al ectodermo a convertirse en tejido epidérmico y 3) el tejido organizador actúa mediante la secreción de moléculas que bloquean esta inducción, y permiten así que el ectodermo esté "protegido" por estos factores para llegar a ser neural.



Fig. 10-29. Estructuras neurales inducidas en el ectodermo presuntivo por el tejido del labio dorsal del tritón, separadas del ectodermo por un filtro de Nucleoporo con un diámetro de poro promedio de 0,05 mm. Los tejidos neurales anteriores son evidentes, incluidos algunos ojos inducidos. (De Toivonen 1979; fotografía cortesía de L. Saxén.)

NOGINA. En 1992 fue aislada la primera de estas moléculas organizadoras solubles. Smith y Harland (1992) construyeron una biblioteca de plásmidos de cDNA a partir de una gástrula dorsalizada (tratada con cloruro de litio). Los mRNA sintetizados desde los grupos de estos plásmidos fueron inyectados en embriones ventralizados (que no tenían tubo neural) producidos mediante la irradiación de embriones tempranos con luz ultravioleta. Aquellos grupos de plásmidos cuyos mRNA rescataban el eje dorsal en estos embriones fueron separados en grupos más pequeños y así sucesivamente, hasta que fueron aislados clones de un solo plásmido cuyos mRNA pudieron restaurar el eje dorsal en tales embriones. Uno de estos clones contenía al gen **nogina** (fig. 10-30). Smith y Harland demostraron que el mRNA de *nogina* recién transcrito se localiza primero en la región del labio dorsal del blastoporo y luego llega a expresarse en la notocorda (fig. 10-31). Las inyecciones del mRNA de *nogina* en una célula de embriones irradiados con UV rescataban por completo el eje dorsal y permitían la formación de un embrión entero. *Nogina* es una proteína secretada y en 1993, Smith y col. hallaron que *Nogina* podía llevar a cabo dos de las principales funciones del organizador: inducir al ectodermo dorsal para formar tejido neural y dorsalizar a las células del mesodermo que de otro modo podrían contribuir al mesodermo ventral. Nogina se une a BMP4 y BMP2 e inhibe sus uniones a los receptores (Zimmerman y col. 1996).

CORDINA Y RELACIONADA CON NODAL-3. La segunda proteína organizadora fue **cordina**. Ésta fue aislada a partir de clones de cDNA cuyos mRNA estaban presentes en

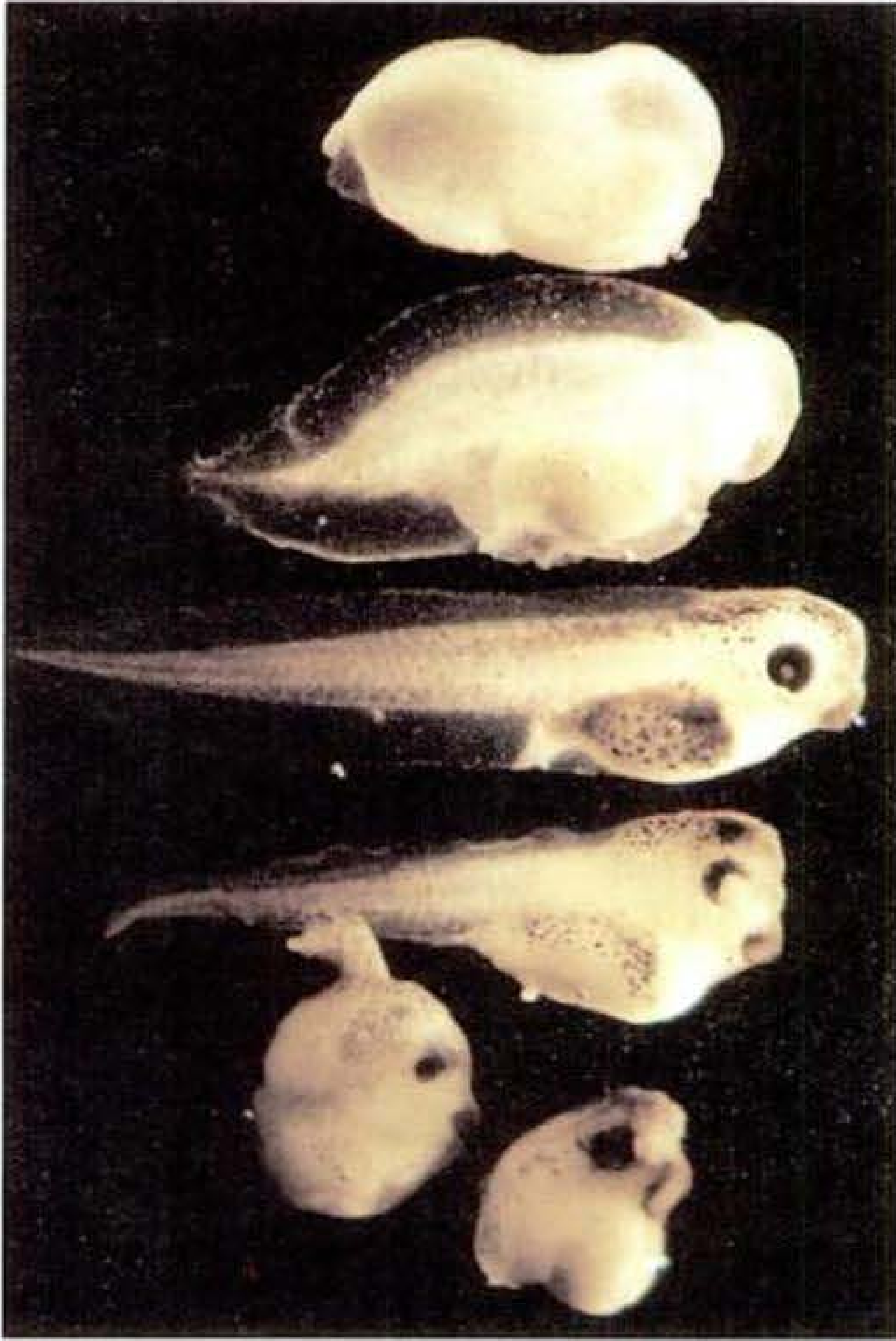


Fig. 10-30. Rescate de las estructuras dorsales por la proteína *Nogina*. Cuando los huevos de *Xenopus* son expuestos a radiación ultravioleta, la rotación cortical no se produce y los embriones carecen de estructuras dorsales (superior). Si uno de estos embriones es inyectado con mRNA de *nogina*, éste desarrolla estructuras dorsales de un modo dosis dependiente (superior a inferior). Si es inyectado demasiado mensajero de *nogina*, el embrión produce tejido anterior dorsal a expensas del tejido ventral y posterior, convirtiéndose en un poco más que un cabeza (inferior). (Fotografías cortesía de R. M. Harland.)

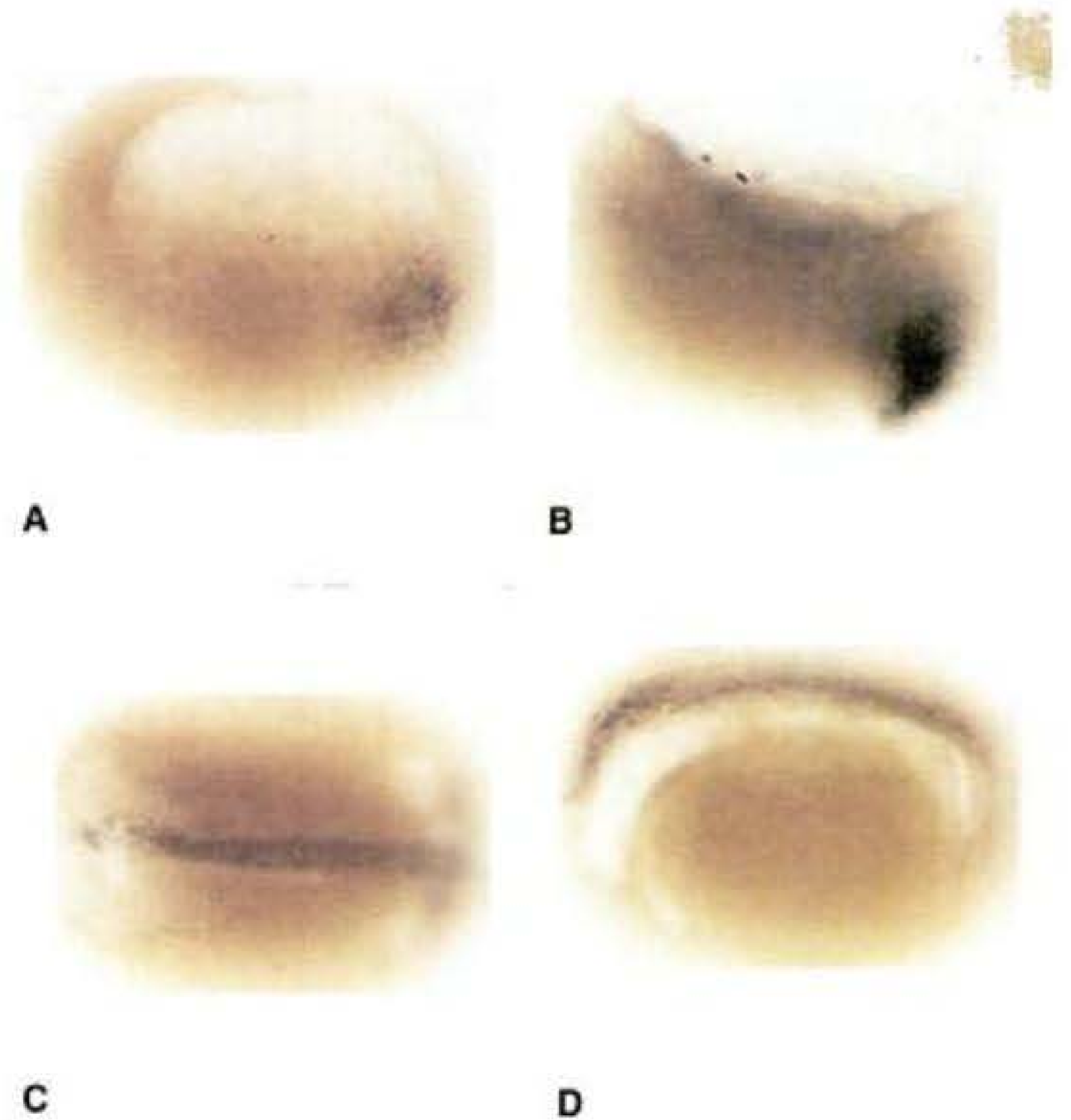


Fig. 10-31. Localización del mRNA de *nogina* en el tejido organizador, mostrado por hibridación in situ. **A.** En la gastrulación, el mensajero de *nogina* (áreas oscuras) se acumula en la zona marginal dorsal. **B.** Cuando las células involucionan, el mRNA de *nogina* es visto en el labio dorsal del blastoporo. **C.** Durante la extensión convergente, el mensajero de *nogina* es expresado en los precursores de la notocorda, de la placa precordal y del endodermo faríngeo, que se extienden **(D)** por debajo del ectodermo en el centro del embrión. (Fotografías cortesía de R. M. Harland.)

embriones dorsalizados pero no en los ventralizados (Sasai y col. 1994). Estos clones fueron analizados mediante su inyección en blastómeras ventrales y observando si inducían ejes secundarios. Uno de estos clones capaz de inducir un tubo neural secundario contenía el gen *cordina*. Se encontró que el mRNA de *cordina* estaba localizado en el labio dorsal del blastoporo y tardíamente en el mesodermo dorsal de la notocorda (fig. 10-32), y se vio que oligómeros antisentido de morfolino (véase cap. 4) dirigidos contra el mensajero *cordina* bloqueaban por completo la inducción del sistema nervioso central de *Xenopus* (Oelgeschläger y col. 2003). Como Nogina, cordina se une directamente a BMP4 y a BMP2 y evita la unión de éstos a sus receptores (Piccolo y col. 1996). En el pez cebra, una mutación de pérdida de función de *cordina* (el mutante *chordino*) tiene una placa neural muy reducida y una región de mesodermo ventral aumentada de tamaño (Hammerschmidt y col. 1996). La **proteína relacionada con Nodal 3** (Xnr-3) es sintetizada por las células superficiales del organizador y también es capaz de bloquear a BMP4 (Smith y col. 1995; Hansen y col. 1997).

FOLISTATINA Y ADMP. La cuarta proteína secretada por el organizador, **folistatina**, fue encontrada en el organizador a través del inesperado resultado de un experimento que buscaba algo más. Ali Hemmati-Brivanlou y Douglas Melton (1992, 1994) querían ver si la proteína Activina era crítica para la inducción del mesodermo, entonces construyeron un receptor de Activina dominante negativo y lo inyectaron en el embrión de *Xenopus*. Sorprendentemente, el ectodermo de estos embriones comenzó a expresar proteínas específicas neurales. Parece que el receptor de activina (que también une a otras moléculas estructuralmente semejantes como las proteínas morfogenéticas del hueso) normalmente funcionaba uniendo un inhibidor de la neurulación. Cuando su función fue bloqueada, todo el ectodermo se convirtió en neural. En 1994, Hemmati-Brivanlou y Melton propusieron un "modelo de neurulación por defecto" por medio del cual el organizador funcionaba produciendo inhibidores de lo que inducía la formación de la epidermis. Es decir, el destino "normal" de una célula ectodérmica era llegar a ser neurona; ésta tenía que ser inducida para llegar a ser un célula epidérmica de la piel. El organizador evita de algún modo que las células ectodérmicas sean inducidas. Este modelo fue apoyado y explicado por algunos experimentos de disociación celular que también habían producido extraños resultados. Tres estudios, los

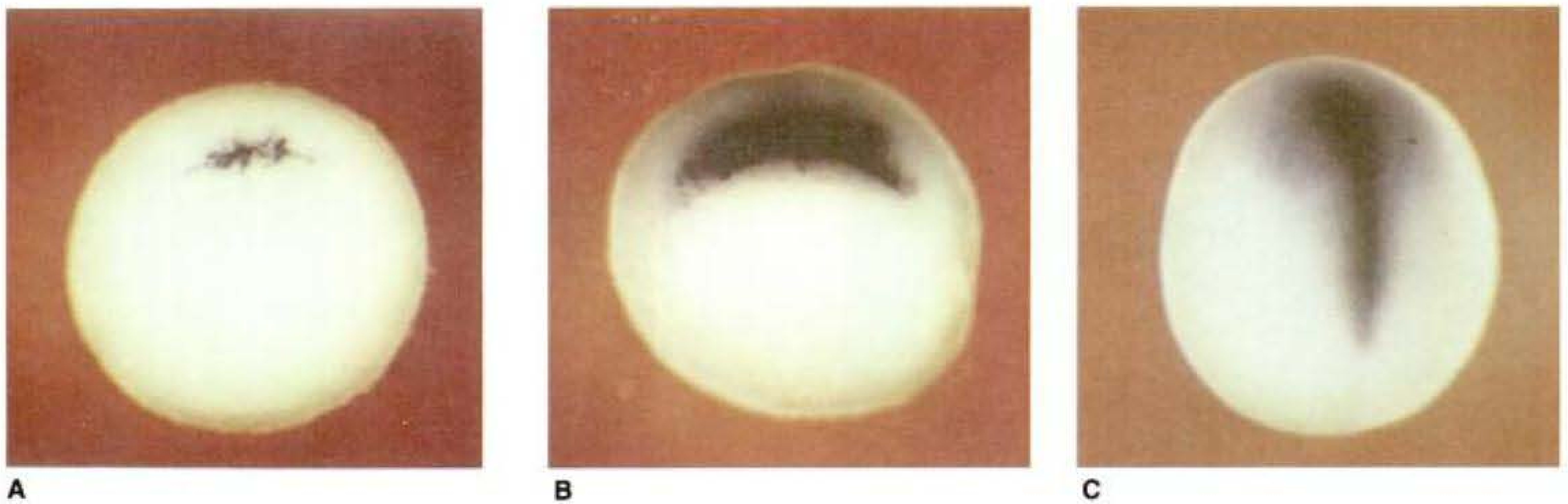


Fig. 10-32. Localización del mRNA de *cordina*. **A.** Hibridación in situ en embriones in toto (enteros) que muestran que justo previo a la gastrulación, el mensajero de *cordina* (área oscura) es expresado en la región que se convertirá en el labio dorsal del blastoporo. **B.** Cuando comienza la gastrulación, *cordina* es expresada en el labio dorsal del blastoporo. **C.** En los estadios tardíos de la gastrulación, el mensajero de *cordina* es visto en los tejidos del organizador. (De Sasai y col. 1994; fotografías cortesía de E. De Robertis.)

de Grunz y Tacke (1989), Sato y Sargent (1989) y Godsave y Slack (1989) han demostrado que cuando los embriones enteros o sus casquetes animales eran disociados, formaban tejido neural. Este resultado podría ser explicado si el "estado por defecto" del ectodermo no era epidérmico, sino neural y el tejido tenía que ser inducido a tener un fenotipo epidérmico. El organizador, entonces, bloquearía esta inducción epidermalizante.

Debido a que naturalmente la proteína Folistatina se une e inhibe a la Activina (y a otras proteínas relacionadas), se postuló la hipótesis de que ésta podría ser uno de los factores secretados por el organizador. Con el uso de hibridación in situ, Hemmati-Brivanlou y Melton (1994) hallaron el mRNA para folistatina en el labio dorsal del blastoporo y en la notocorda. Entonces parece que podría haber un estado neural por defecto y un destino epidérmico inducido activamente. Esta hipótesis era contraria al modelo de inducción neural que la había precedido por 70 años. Pero ¿cuáles eran las proteínas inductoras de la epidermis? y ¿ellas estaban realmente siendo bloqueadas por las moléculas secretadas por el organizador?

En *Xenopus*, el inductor epidérmico es la **proteína morfogenética del hueso 4** (BMP4). Era conocido que hay una relación antagonista entre BMP4 y el organizador. Si el mRNA para BMP4 es inyectado en los huevos de *Xenopus*, todo el mesodermo en el embrión se convierte en mesodermo ventrolateral y no se produce involución en el labio del blastoporo (Dale y col. 1992; Jones y col. 1992). Por el contrario, la sobreexpresión de un receptor dominante negativo de BMP4 resultó en la formación de dos ejes dorsales (Graff y col. 1994; Suzuki y col. 1994). En 1995, Wilson y Hemmati-Brivanlou demostraron que BMP4 inducía a las células ectodérmicas para que se conviertan en epidérmicas. Hacia 1996, varios laboratorios habían demostrado que Nogina, Cordina y Folistatina eran secretadas por el organizador y que cada una de ellas evitaba que BMP se uniera al ectodermo y al mesodermo cercano al organizador (Piccolo y col. 1996; Zimmerman y col. 1996; Iemura y col. 1998).

BMP4 es expresado inicialmente en todas las regiones del ectodermo y del mesodermo de la blástula tardía.* Sin embargo, durante la gastrulación, los transcritos de *bmp4* están restringidos a la zona marginal ventrolateral. Esto se debe probablemente a que la proteína Xiro1 es producida en la región del mesodermo dorsal (organizador) a partir del inicio de la gastrulación y este factor de transcripción reprime la transcripción de *bmp4* (Hemmati-Brivanlou y Thomsen 1995; Northrop y col. 1995; Glavic y col. 2001).

Cuando BMP4 se une a las células, activa la expresión de los genes que codifican factores de transcripción como *Xvent1*, *Xmsx1*, *Vox* y *Xom*, que inducen la expresión de la diferenciación epidérmica y mesodérmica ventral. Al mismo tiempo, estos factores de transcripción suprimen los genes que podrían producir un fenotipo neural (Suzuki y col. 1997b; Yamamoto y col. 2000). Bajas dosis de BMP4 parecen activar la formación de músculo; niveles intermedios instruyen a las células a convertirse en riñón, mientras que altas dosis activan los genes que instruyen al mesodermo a convertirse en células sanguíneas (Hemmati-Brivanlou y Thomsen 1995; Gawantka y col. 1995; Dosch y col. 1997). Las dosis variables son creadas por la interacción de BMP4 (que viene del mesodermo lateral y ventral) con los antagonistas de BMP que vienen del organizador† (fig. 10-33).

Por lo tanto, hacia 1996, había un consenso que BMP4 era el inductor activo del ectodermo ventral (epidermis) y el ventralizador del mesodermo (células sanguíneas y tejido conectivo), y que Nogina, Cordina y Folistatina

* Los detalles de la producción y degradación de BMP4 se explican en el capítulo 23.

† Es posible que BMP4 sea producido mediante interacciones de una "vía de Wnt no canónica" que activa al factor de transcripción NF-AT (Saneyoshi y col. 2002). En este sentido, las acciones de las diferentes proteínas Wnt tienen funciones opuestas en los embriones de *Xenopus*.

podrían impedir su función. El organizador funciona mediante la secreción de inhibidores de BMP4 y no induciendo neuronas directamente.

Las proteínas difusibles del organizador II: los inhibidores de Wnt

Se pensaba que todo el tejido neural inducido por el organizador era inducido para llegar a ser cerebro anterior y que la notocorda representaba la porción más anterior del organizador. Sin embargo, las regiones más anteriores de la cabeza y del cerebro no tienen por debajo a la notocorda, sino al endodermo faríngeo y al mesodermo de la cabeza (precordal). Este "endomesodermo" constituye el borde de avance del labio dorsal del blastoporo. Estudios recientes han demostrado que estas células no solo inducen a las estructuras más anteriores de la cabeza, sino que lo hacen mediante el bloqueo de la vía de Wnt así como al bloquear a BMP4.

CERBERUS. En 1993, Christian y Moon demostraron que Xwnt8, un miembro de la familia de los factores de crecimiento y diferenciación de Wnt, inhibía la inducción neural. Se halló que Xwnt8 era sintetizado en todo el mesodermo marginal –excepto en la región que forma el labio dorsal. Por lo tanto, además de BMP4, una segunda proteína anti-neuralizante estaba siendo secretada desde el mesodermo no organizador. ¿Había alguna proteína en el organizador que contrarrestaba esta actividad?

En 1996, Bouwmeester y sus colegas demostraron que la inducción de las estructuras más anteriores de la cabeza podía llevarse a cabo por una proteína secretada denominada **Cerberus.*** A diferencia de otras proteínas secretadas, Cerberus promueve la formación de la glándula de cemento (la región más anterior del ectodermo del renacuajo), de los ojos y de las placodas olfatorias (nasales). Cuando el mRNA de *cerberus* fue inyectado en una blastómera vegetal ventral de *Xenopus* en el estadio de 32 células, se formaron estructuras ectópicas de la ca-

* "Cerberus" es otro nombre originado de la mitología griega; el nombre de la proteína es posterior al del perro de tres cabezas que custodiaba la puerta de Hades.

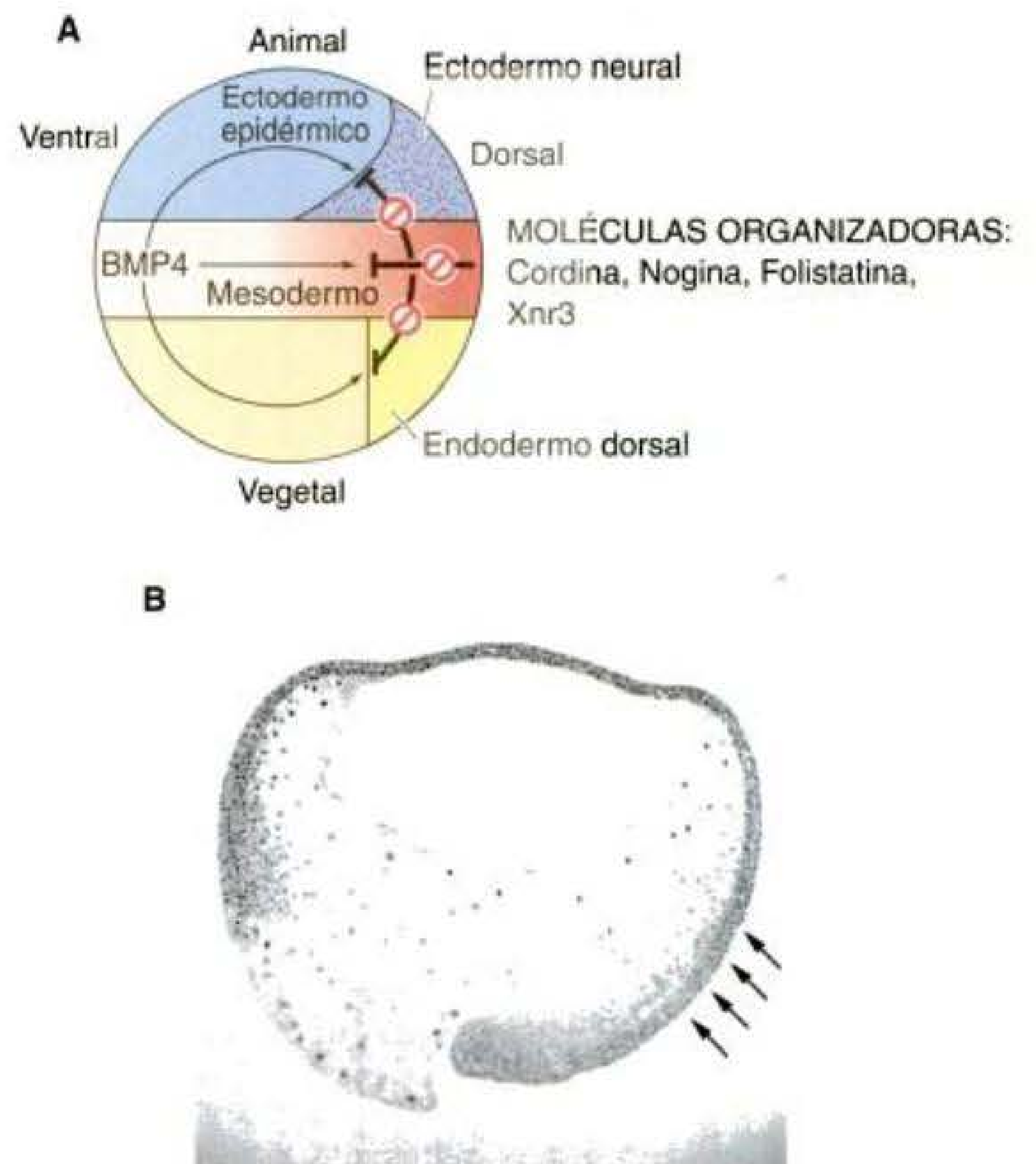


Fig. 10-33. Modelo para la acción del organizador. **A.** BMP4 (y algunas otras moléculas) es un poderoso factor ventralizante. Las proteínas del organizador como cordina, Nogina y folistatina bloquean la acción de BMP4. Los efectos antagonistas de estas proteínas pueden verse en las tres capas germinales. BMP4 puede provocar la expresión de diferentes genes en un modo dependiente de la concentración. Por lo tanto, en las regiones de expresión de Nogina y cordina, a BMP4 se le impide por completo unirse y estos tejidos se convierten en el tejido de la notocorda (organizador). Ligeramente más lejos del organizador, es activado *myf5*, un marcador para las células musculares dorsolaterales. A medida que se les permite unirse a las células, a más y a más moléculas de BMP4, llegan a expresarse los genes *Xvent2* (ventrolateral) y *Xvent1* (ventral). **B.** Vía de activación de BMP visualizada en la gastrulación temprana de un embrión de *Xenopus*. Anticuerpos específicos para la forma fosforilada de Smad1 (es decir, para Smad1 que ha sido activado por BMP4) pueden verse uniéndose a células ectodérmicas en la porción ventral del embrión. Cerca del labio dorsal hay un gradiente de inactivación de BMP4 (flechas). (Según Dosch y col. 1997; De Robertis y col. 2000; B, de Kurata y col. 2000, fotografía cortesía de N. Ueno.)

Información adicional y especulaciones

BMP4 y la langosta de Geoffroy

La hipótesis de que el organizador secreta proteínas que bloquean a BMP4 recibió crédito adicional desde una fuente inesperada –el campo emergente de la biología del desarrollo evolutiva. De Robertis, Kimelman y otros (Holley y col. 1995; Schmidt y col. 1995; De Robertis y Sasai 1996) hallaron que la misma interacción cordina-BMP4 que instruía la formación del tubo neural en vertebrados también formaba tejido neural en las moscas de la fruta. El tubo neural dorsal de los vertebrados y el cordón neural ventral de la mosca parecen ser generados por el mismo grupo de instrucciones, conservadas a lo largo de la evolución. Éste fue el segundo cambio de paradigma ocasionado por la nueva información adquirida sobre la biología molecular de la inducción.

El gen de *Drosophila* homólogo a *bmp4* es *decapentaplegic* (*dpp*). Como se explicó en el capítulo anterior, la proteína Dpp es responsable del establecimiento del patrón del eje dorsoventral de *Drosophila* y está presente en la porción dorsal del embrión y se difunde ventralmente. Ésta es contrarrestada por una proteína denominada Short-gatrulation (Sog), que es el homólogo de *Drosophila* para cordina. Estas proteínas homólogas no solo parecen similares, pueden en realidad ser sustituidas una por la otra. Cuando mRNA de *sog* es inyectado en las regiones ventrales de embriones de *Xenopus*, ésta induce notocorda y tubo neural de *Xenopus*. La inyección de mRNA de cordina en los embriones de *Drosophila* produce tejido nervioso ventral. Aunque cordina generalmente dorsaliza al embrión de *Xenopus*, ventraliza al embrión de *Drosophila*. En *Drosophila*, Dpp es producida dorsalmente; en *Xenopus*, BMP4 es producida ventralmente. En ambos casos Sog/cordina producen tejido neural mediante el bloqueo de los efectos de Dpp/BMP4. En *Drosophila*, Sog interactúa con Tolloid y varias otras proteínas que crean un gradiente de proteínas Sog. En *Xenopus*, el homólogo de las mismas proteínas actúa para crear un gradiente de cordina (véase fig. 23-14; Hawley y col. 1995; Holley y col. 1995; De Robertis y col. 2000).

En 1822, el anatomista francés Étienne Geoffroy Saint-Hilaire provocó una de las confrontaciones más acaloradas y críticas en biología cuando propuso que la langosta era tan solo el vertebrado al revés. Afirmó que el lado ventral de la langosta (con su cordón nervioso) era homólogo al lado dorsal del vertebrado (Appel 1987). Parece que estaba en lo correcto desde el punto de vista molecular, si bien no desde el anatómico. De Robertis y Sasai (1996) han propuesto que había un ancestro común para todo el filo bilateral –una criatura hipotética (dubbed Urbilateria) de unos 600 millones de años que fue el ancestro de los subreinos de los protostomas y de los deuterostomas. La interacción BMP4(Dpp)/cordina(Sog) es un ejemplo de "procesos homólogos", que sugieren una unidad de principios de desarrollo entre todos los animales (Gilbert y Bolker 2001).

beza (fig. 10-34). Estas estructuras de la cabeza fueron producidas desde las células inyectadas y además desde las células vecinas. El gen *cerberus* es expresado en las células del endomesodermo faríngeo que se originan desde las células profundas del labio dorsal temprano, y la proteína Cerberus puede unir a BMP, proteínas relacionadas a Nodal y Xwnt8 (fig. 10-35; Glinka y col. 1997; Piccolo y col. 1999).

FRZB Y DICKKOPF. Poco tiempo después de haberse demostrado los atributos de Cerberus, se descubrió que otras dos proteínas, Frzb y Dickkopf, eran sintetizadas en el endodermo en involución. **Frzb** (pronunciado "frisbee") es una forma pequeña y soluble de Frizzled, el receptor de Wnt, que es capaz de unir a proteínas de Wnt en solución (figs. 10-35, 10-36; Leyns y col. 1997; Wang y col. 1997). Ésta es sintetizada predominantemente en las células del endomesodermo por debajo de la cabeza (fig. 10-37A). Si se hace que los embriones sinteticen exceso de Frzb, la señal de Wnt no se produce y los embriones carecen de estructuras ventrales posteriores, llegando a se tan solo una cabeza (fig. 10-37B). La proteína **Dickkopf** (alemán; "cabeza grande," "obstinado") también parece interactuar directamente con los receptores de Wnt, que evitan la señalización de Wnt (Mao y col. 2001, 2002). La inyección de anticuerpos contra la proteína Dickkopf en el blastocele hace que los embriones resultantes tengan cabezas pequeñas y deformadas sin cerebro anterior (Glinka y col. 1998).



Fig. 10-34. El mRNA de *cerberus* inyectado en una blastómera individual D4 (vegetal ventral) de un embrión de *Xenopus* de 32 células induce estructuras de la cabeza así como un corazón y un hígado duplicados. El ojo secundario (un ojo único cíclope) y la placoda olfatoria pueden verse fácilmente. (De Bouwmeester y col. 1996; fotografías cortesía de E. M. De Robertis.)

Glinka y col. (1997) debido a esto han propuesto un nuevo modelo para la inducción embrionaria. La inducción de las estructuras del tronco puede causarse por el bloqueo de la señal de BMP desde la notocorda. Sin embargo, para producir una cabeza, la señal de BMP y la señal de Wnt deben ser bloqueadas. Este bloqueo viene desde el endomesodermo, ahora considerado la porción más anterior del organizador.

Conversión del ectodermo a células de la placa neural

Hasta ahora se han discutido los factores que evitan que el ectodermo dorsal se convierta en epidermis. Obviamente, una vez que es llevado a cabo, otros genes deben transformar el ectodermo en tejido neural. La proteína clave involucrada en la activación del fenotipo neural en el ectodermo parece ser la **Neurogenina** (Ma y col. 1996). Los factores de transcripción que aparecen en el ectodermo ante la ausencia de BMP son capaces de inducir la expresión de Neurogenina y los factores de transcripción (como Msx1) inducidos en el ectodermo por las señales de BMP son capaces de reprimir la expresión de Neurogenina (fig. 10-38; véase Sasai 1998). Neurogenina es en sí mismo un factor de transcripción y activa a una serie de genes cuyos productos son responsables del

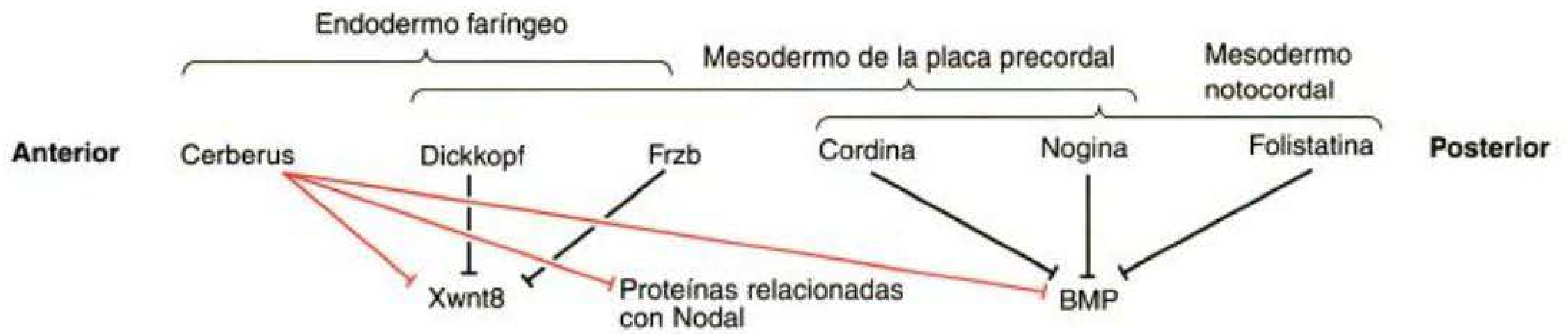


Fig. 10-35. Los factores paracrinos desde el organizador son capaces de bloquear a ciertos otros factores paracrinos. El endodermo faríngeo que se encuentra subyacente a la cabeza secreta Dickkopf y Cerberus. Dickkopf bloquea a las proteínas Wnt; Cerberus bloquea a Wnts, a las proteínas relacionas con Nodal y a las BMP. La placa precordal secreta los bloqueadores de Wnt Dickkopf y Frzb, así como los bloqueadores de BMP cordina y Nogina. La notocorda contiene los bloqueadores de BMP cordina, Nogina y folistatina.

fenotipo neural. Uno de estos genes activados por Neurogenina es el gen para NeuroD, un factor de transcripción que activa a los genes que producen las proteínas estructurales específicas neurales (Lee y col. 1995). Además, Nogina o Cerberus pueden inducir otro factor de transcripción en el ectodermo. Esta proteína es denominada factor cerebral 2 de *Xenopus* (Xbf2; del inglés *Xenopus brain factor* 2) y parece que reprime a los genes epidérmicos (Mariani y Harland 1998). Mediante estos empujones y tirones, el ectodermo dorsal es convertido en el tejido de la placa neural.

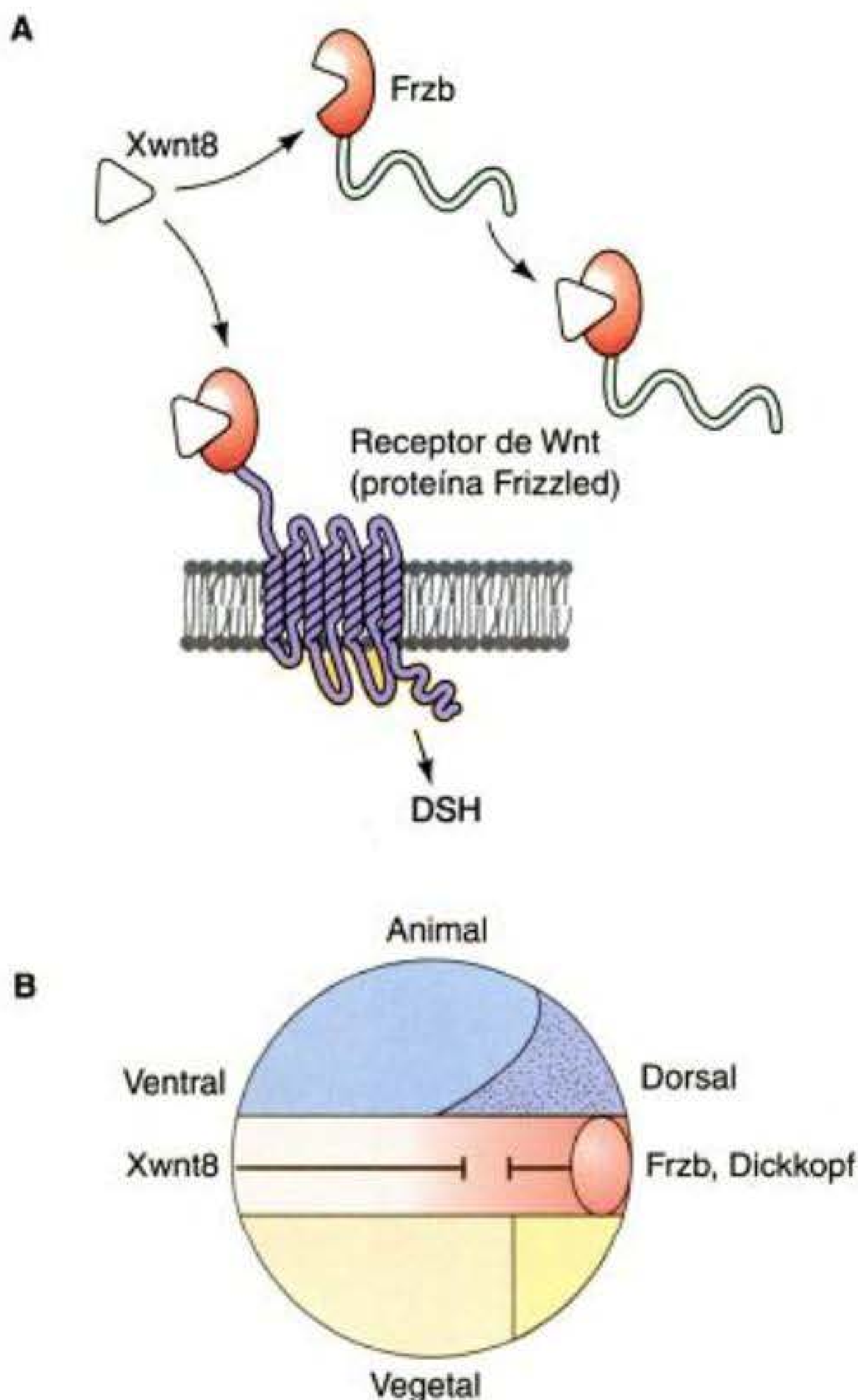


Fig. 10-36. Xwnt8 es capaz de ventralizar al mesodermo y de evitar en el ectodermo la formación de la parte anterior de la cabeza. **A.** Frzb es una proteína secretada por la región anterior del organizador. Ésta se une a Xwnt8 antes que este inductor se pueda unir a su receptor. Frzb se asemeja al dominio de unión de Wnt del receptor de Wnt (proteína Frizzled), pero es una molécula soluble. **B.** Xwnt8 es producida en toda la zona marginal.

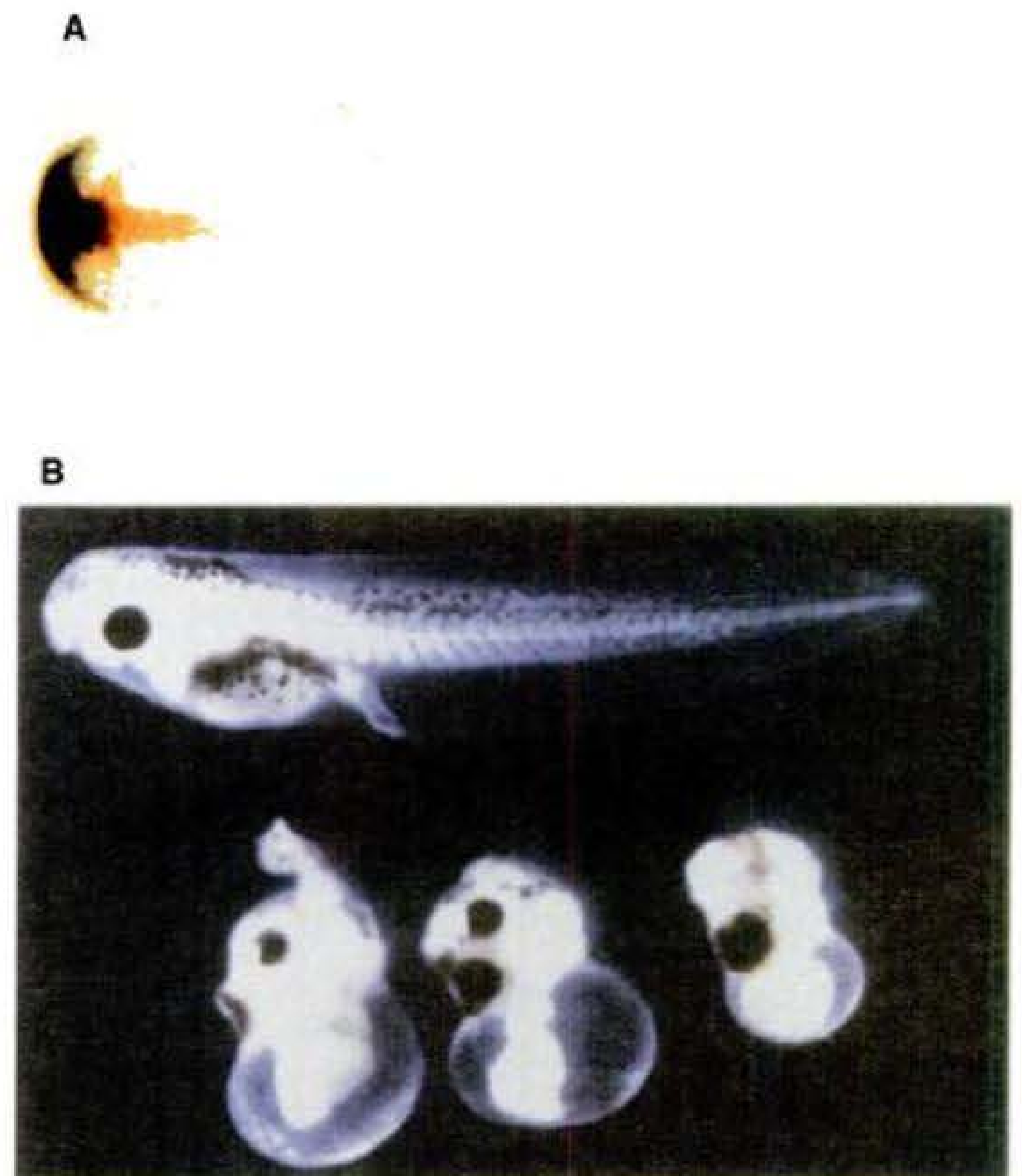
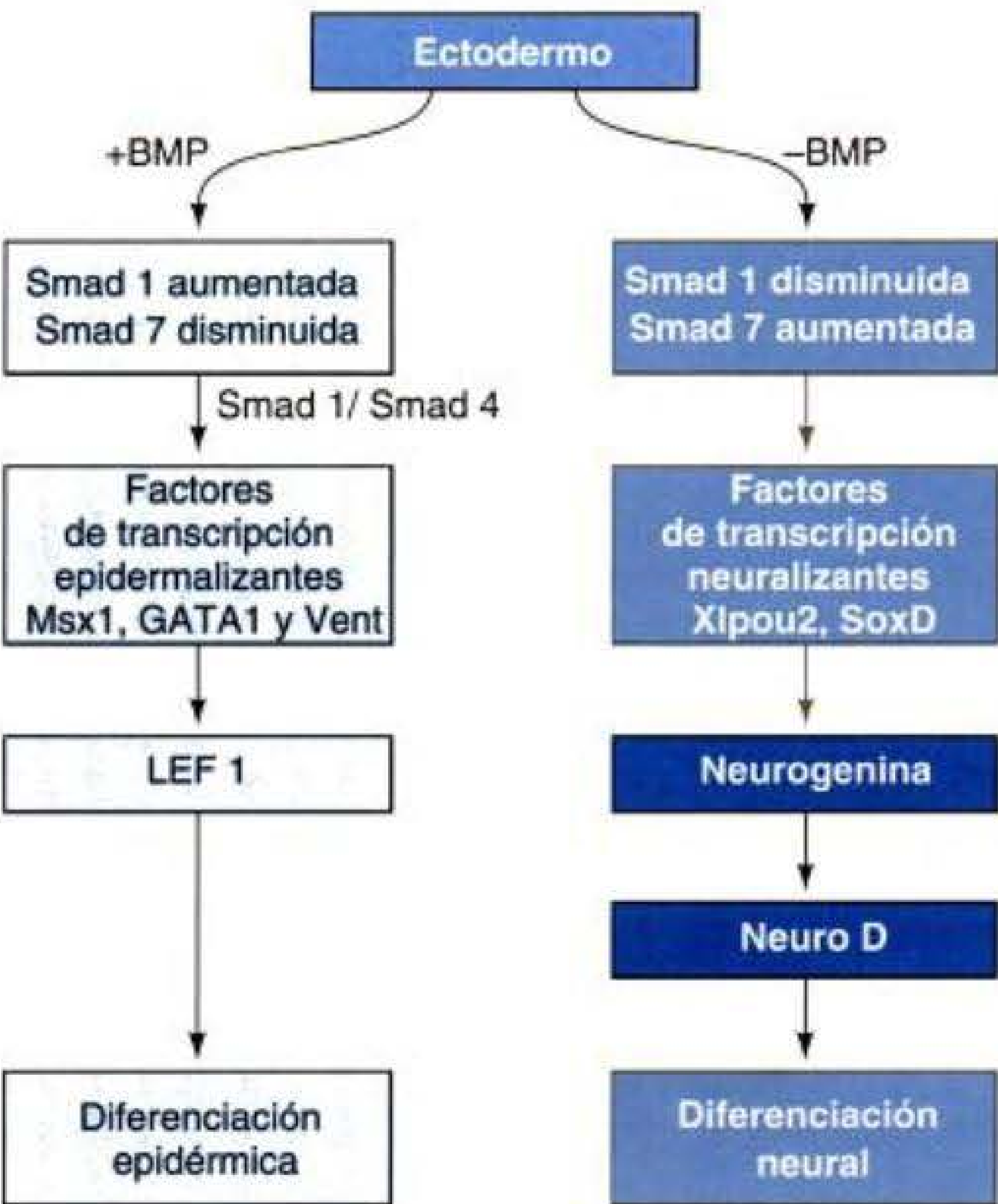


Fig. 10-37. Expresión y función de Frzb. **A.** Hibridación in situ doble que localiza a los mensajeros de Frzb (azul oscuro) y de cordina (marrón). Se ha visto que el mRNA de *frzb* es transcrito en la cabeza del endomesodermo del organizador, pero no en la notocorda (donde es expresada cordina). **B.** La microinyección del mRNA de *frzb* en la zona marginal lleva a la inhibición de la formación del tronco. El embrión control está en la parte superior; los embriones inyectados están en la parte inferior. (De Leyns y col. 1997; fotografías cortesía de E. M. De Robertis.)



SITIO WEB 10.8 **La especificación del endodermo (The specification of the endoderm).** Mientras que el endodermo es inducido y son inducidas las diferencias entre el ectodermo neural y el epidérmico, el endodermo parece especificarse de manera autónoma. Estudios recientes muestran que el factor de transcripción VegT derivado de la madre inicia en las células vegetales una cascada de acontecimientos que conducen a la formación del endodermo.

Fig. 10-38. Vías o rutas de diferenciación hipotéticas del ectodermo hacia epidermis o ectodermo neural. Ante la presencia de la señal de BMP, se generan factores de transcripción epidermalizantes, que llevan a la activación de la vía que le permite a la célula convertirse en un queratinocito epidérmico. En ausencia de la señal de BMP, se producen factores de transcripción neuralizantes. Estos factores activan al gen para la neurogenina. La neurogenina actúa como un factor de transcripción para activar al gen *NeuroD* y NeuroD actúa como un factor de transcripción que causa la diferenciación de la célula a neurona.

Información adicional y especulaciones

Competencia, tendencia y neurulación

Además de las señales que vienen de la placa cordal y del mesodermo dorsal subyacente, podría también haber una tendencia en las células de la parte dorsal del embrión para convertirse en neural. Phillips y colegas (London y col. 1988; Savage y Phillips 1989) han mostrado que las células polares animales ventrales y dorsales del embrión en segmentación temprana difieren en su expresión de la proteína Epi1. No solo hace que las células de la epidermis presuntiva expresen esta proteína, que no es expresada en las células neurales presuntivas, sino que la región de células que no puede expresar Epi1 se incrementa durante la gastrulación. Otras diferencias entre el ectodermo dorsal y ventral también llegan a ser aparentes en este momento, previo a los movimientos de la notocorda por debajo del ectodermo (Otte y Moon 1992; Gamse y Sive 2000). Además, en el mesodermo ventral, las proteínas codificadas por *Xvex1* y *Xvex2* bloquean la expresión de los genes dorsales (Shapira y col. 2000).

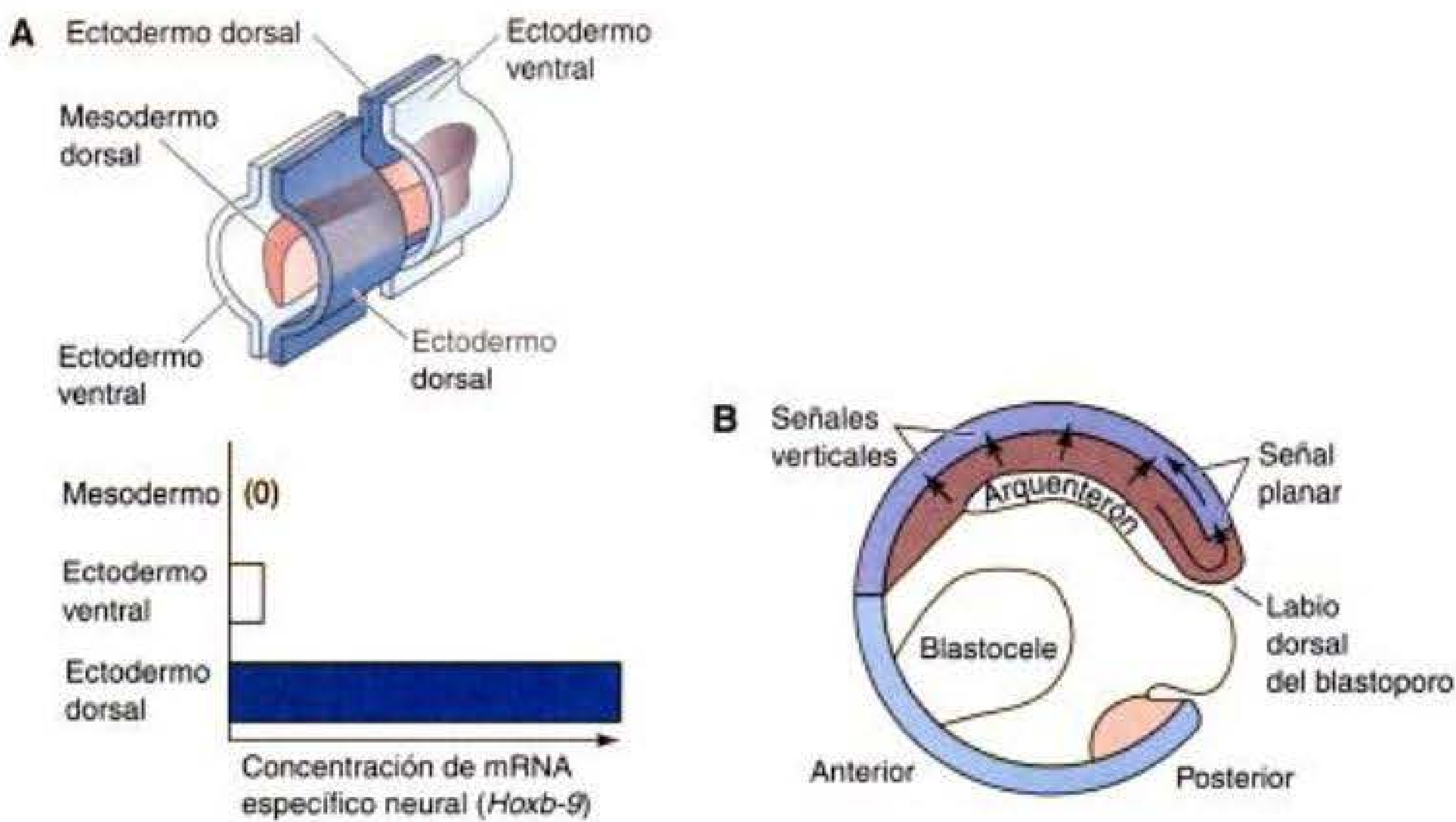


Fig. 10-39. Tendencia ectodérmica hacia la neurulación. **A.** La expresión génica neural se produce más fácilmente en el ectodermo dorsal que en el ectodermo ventral. El tejido mesodérmico dorsal (notocorda) fue envuelto a su alrededor por fragmentos ectodérmicos de los tercios dorsal y ventral del embrión de *Xenopus*. Los fragmentos fueron separados y analizados para la inducción de mRNA neurales. El mesodermo no tenía ninguna concentración de mensajeros neurales, el ectodermo ventral tenía algo y el ectodermo dorsal expresaba altas concentraciones. **B.** Modelo que muestra los dos modos de señalización desde el labio dorsal del blastoporo: un mecanismo vertical a través del mesodermo dorsal y un mecanismo horizontal (planar) a través del ectodermo. (**A**, según Sharpe y col. 1987; **B**, según Doniach 1993.)

Las claves para esta "tendencia" hacia la neurulación podrían ser proporcionadas por señales del labio dorsal viajando de un modo planar (horizontal) a través del ectodermo (fig. 10-39; Sharpe y col. 1987; Dixon y Kintner 1989; Doniach 1993). Las bases moleculares para este sistema de señalización planar "ectodérmico" no son completamente conocidas, pero Wessley y col. (2001) han demostrado que un segundo centro señalizador puede ser inducido en el casquete animal ectodérmico de la blástula por β-catenina y que estas células también activan a cordina, independientemente del mesodermo.

SITIO WEB 10.9 **Inducción planar (Planar induction).** Varios estudios sugieren que el modo planar de transducción de señal –desde el labio dorsal a través del ectodermo– puede ayudar a establecer el patrón del ectodermo. Otros estudios presentados contra la inducción planar no le otorgan ningún papel en el establecimiento del patrón del ectodermo.

Especificidad regional de la inducción

Determinación de las diferencias regionales

Uno de los fenómenos más fascinantes en la inducción neural es la especificidad regional de las estructuras neurales que son producidas. El cerebro anterior, el cerebro posterior (rombencéfalo) y las regiones espinales caudales del tubo neural deben organizarse apropiadamente en una dirección anteroposterior. El tejido organizador no solo induce al tubo neural, sino que además especifica las regiones del tubo neural. Esta inducción específica de región fue demostrada por el marido de Hilde Mangold, Otto Mangold (1933). Él trasplantó cuatro regiones sucesivas del techo del arquenterón de embriones de tritón de gástrula tardía hacia blastoceles de embriones de gástrula temprana (fig. 10-40). La porción más anterior del techo del arquenterón indujo balanceadores y porciones del aparato oral (fig. 10-40A); la sección siguiente más anterior indujo la formación de varias estructuras de la cabeza, que incluyen la nariz, los ojos, los balanceadores y las vesículas óticas (fig. 10-40B); la tercera sección indujo las estructuras del cerebro posterior (rombencéfalo) (fig. 10-40C) y la sección más posterior indujo la formación de mesodermo dorsal del tronco y de mesodermo de la cola* (fig. 10-40D). Además, cuando los labios dorsales del blastoporo de una gástrula de salamandra temprana fueron trasplantados hacia otra gástrula de salamandra temprana, formaron cabezas secundarias. Sin embargo, cuando los labios dorsales de las gástrulas tardías fueron trasplantados hacia la gástrula de salamandra temprana, inducían la formación de colas secundarias (fig. 10-41; Mangold 1933). Los resultados muestran que las primeras células del organizador que ingresan al embrión inducen la formación de cerebros y cabezas, mientras que las células que forman el labio dorsal de embriones de estadio tardío inducen a las células por arriba de ellas a convertirse en médulas espinales y colas.

* La inducción del mesodermo dorsal –en lugar del ectodermo dorsal del sistema nervioso– por el extremo posterior de la notocorda fue confirmada por Bijtel (1931) y Spofford (1945), quienes demostraron que el quinto posterior de la placa neural da origen a los somitas de la cola y a las porciones posteriores del conducto renal pronéfrico.

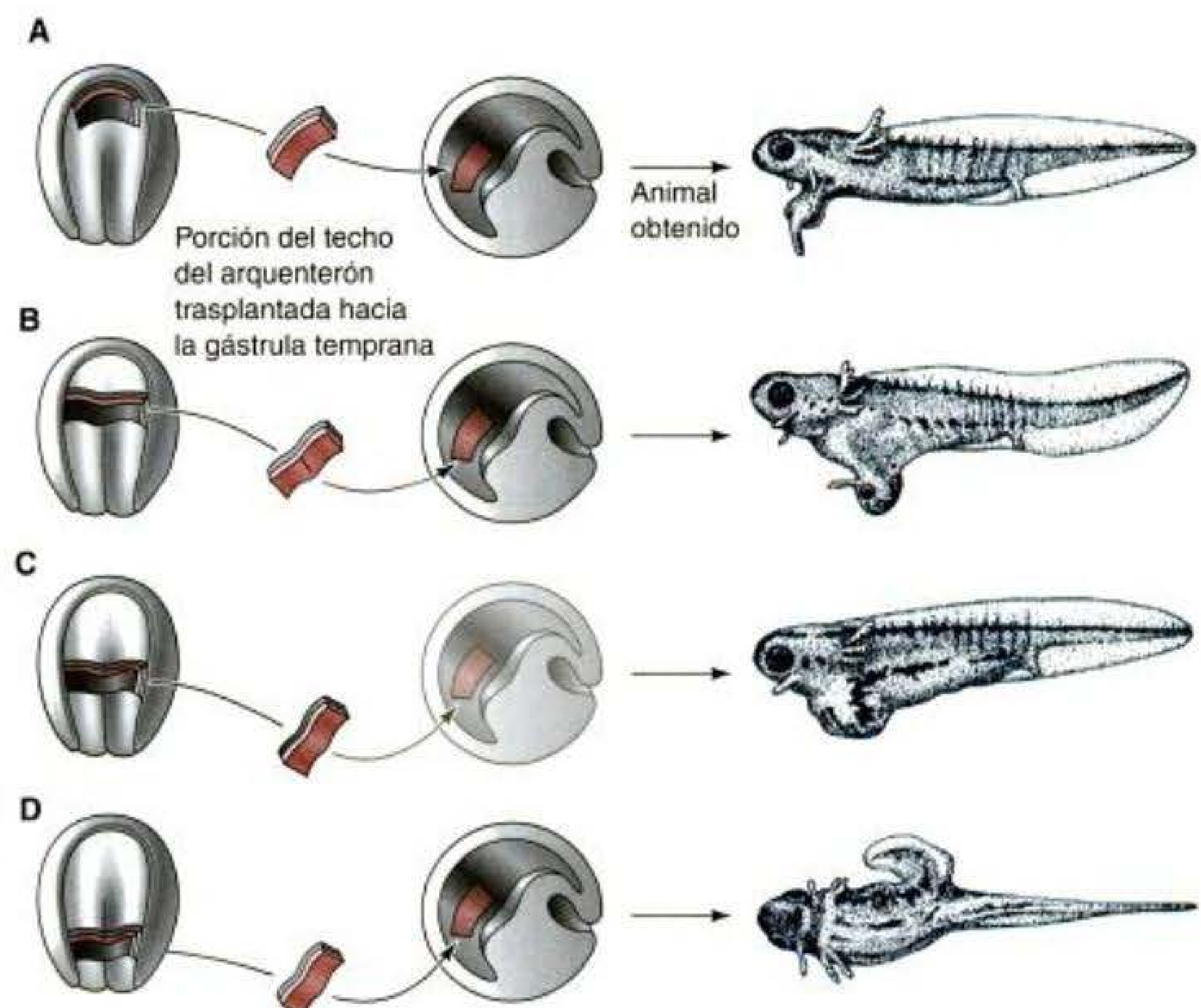
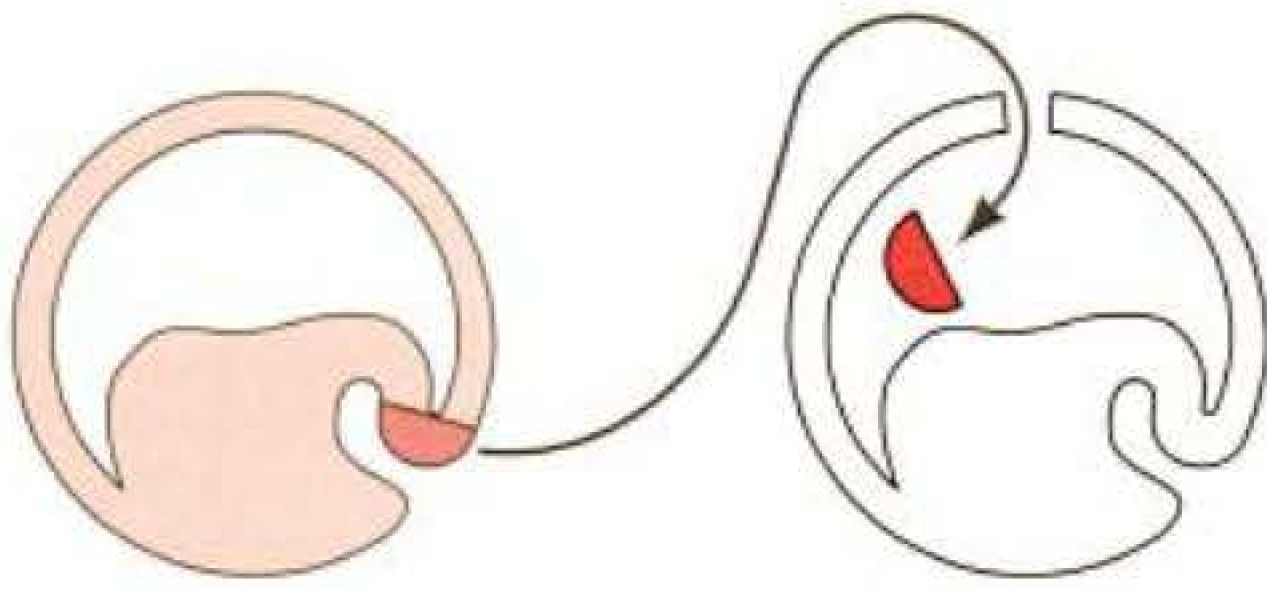
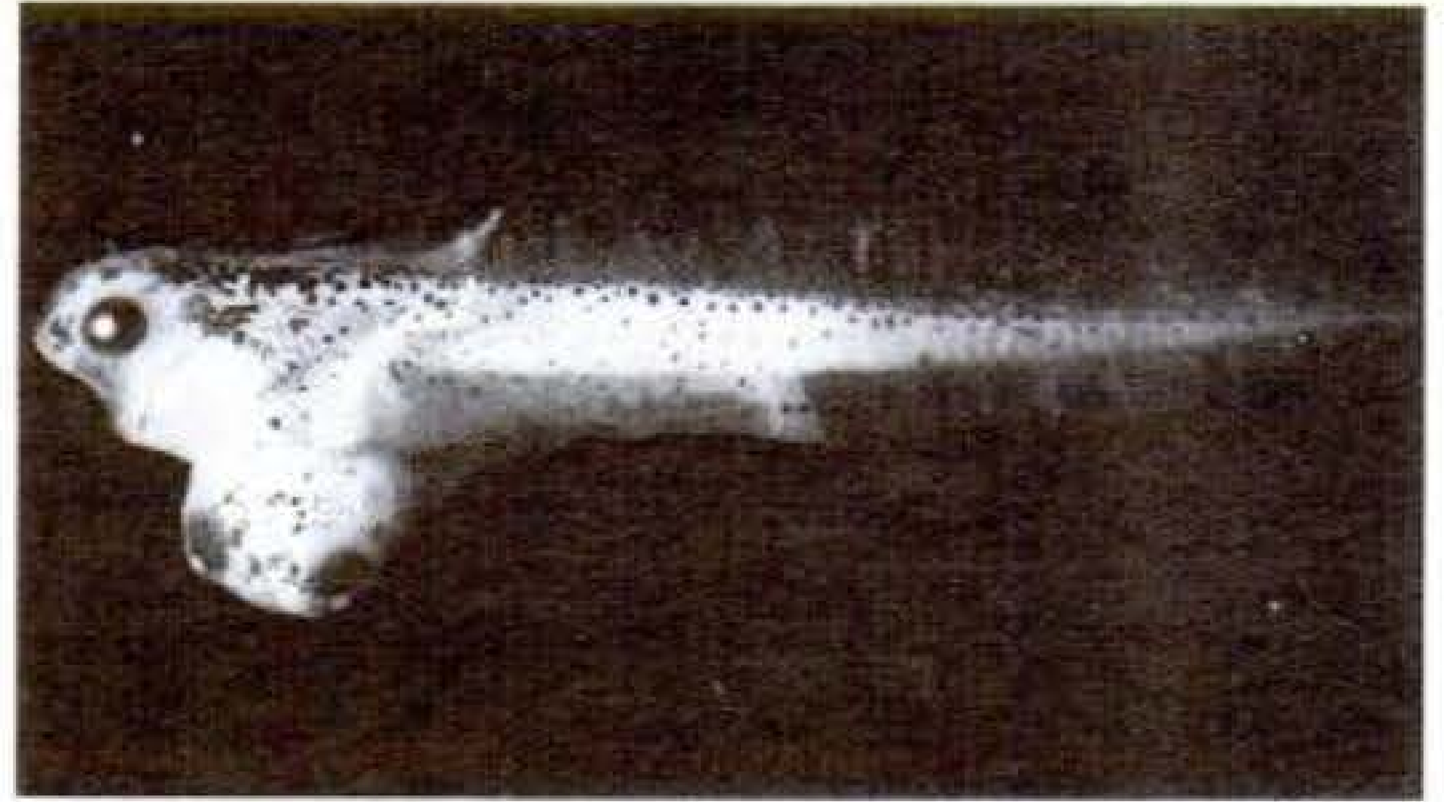


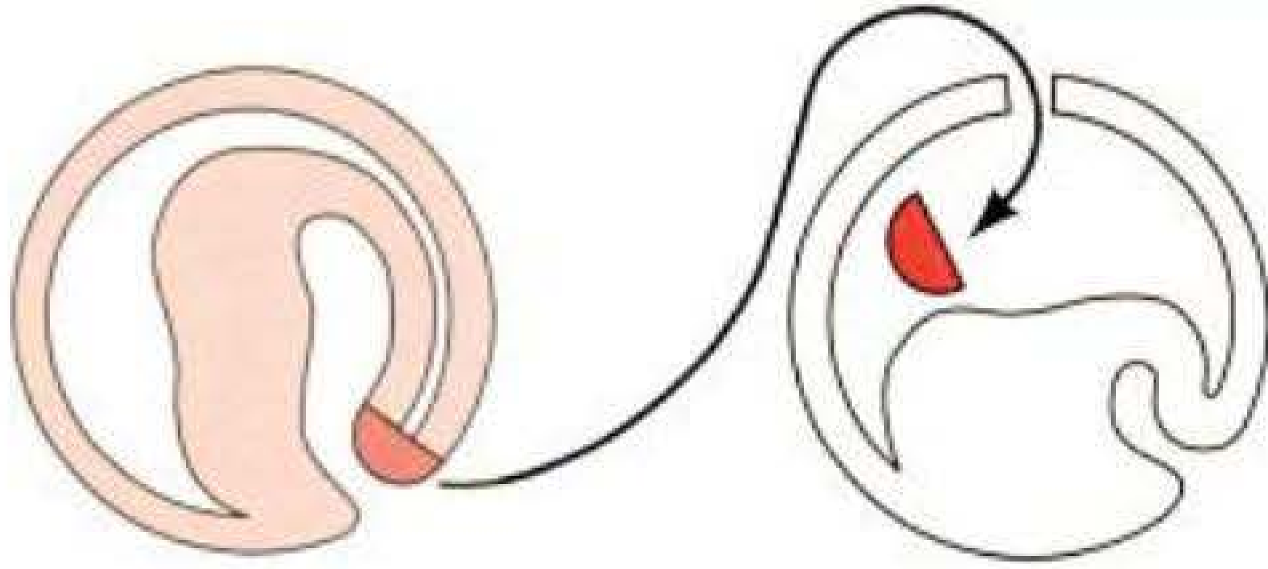
Fig. 10-40. La especificidad regional de la inducción puede demostrarse mediante la implantación de diferentes regiones (color) del techo del arquenterón hacia la gástrula temprana de *Triturus*. Los embriones obtenidos desarrollan estructuras dorsales secundarias. **A.** Cabeza con balanceadores. **B.** Cabeza con balanceadores, ojos y cerebro anterior. **C.** Parte posterior de la cabeza, diencéfalo y vesículas óticas. **D.** Segmento tronco-cola. (Según Mangold 1933.)

A Trasplante del labio dorsal de una gástrula joven





B Trasplante del labio dorsal de una gástrula avanzada



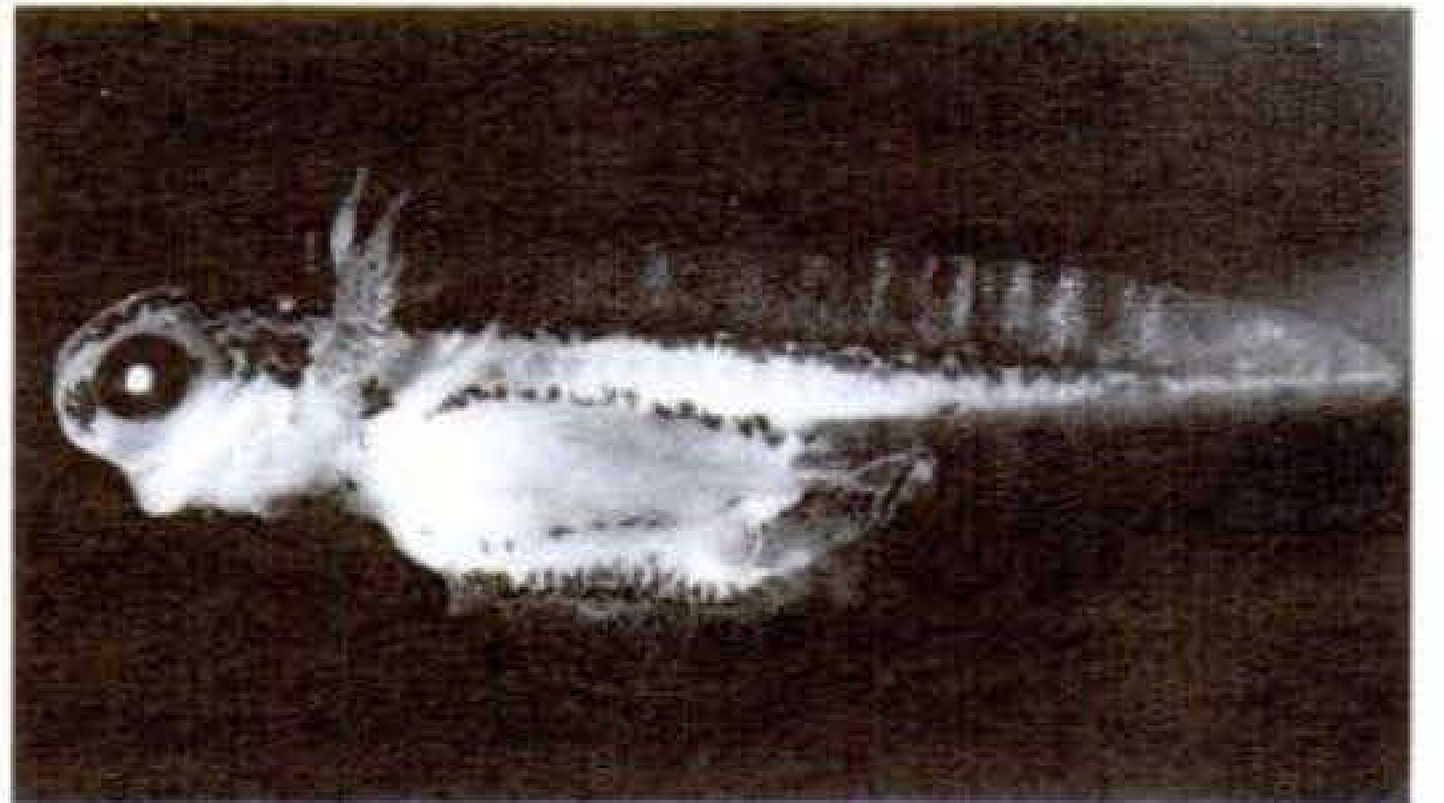


Fig. 10-41. Acción inductiva regionalmente específica del labio dorsal del blastoporo. **A.** Labios dorsales jóvenes (que formarán la porción anterior del organizador) inducen estructuras dorsales anteriores cuando son trasplantados hacia gástrulas tempranas de tritón. **B.** Labios dorsales tardíos trasplantados hacia gástrulas de tritón tempranas producen estructuras dorsales más posteriores. (De Saxén y Toivonen 1962; fotografías cortesía de L. Saxén.)

Las proteínas transformantes posteriores: señales de Wnt y ácido retinoico

En 1938; Sulo Toivonen halló que ciertos órganos inducían solo parte del eje de anfibios. Además, estos órganos no provenían de un anfibio. El *hígado* del cobayo de Guinea, por ejemplo, cuando era colocado en una gástrula temprana de salamandra, podía inducir solo estructuras del cerebro anterior. La *médula ósea* del cobayo de Guinea, sin embargo, podía transformar todo el tubo neural hacia células de la médula espinal. Cuando se juntaban a estos tejidos en el blastocele, se podían generar todas las estructuras del tubo neural, incluidos los tejidos similares al cerebro posterior (rombencéfalo) que no fueron vistos solos. Toivonen y Saxén (1955, 1968; revisión de Saxén 2001; véase sitio Web 10-10) postularon dos gradientes en embriones de anfibios: un gradiente dorsal de actividad "neuralizante" y un gradiente caudal de actividad posteriorizante ("mesodermalizante"). La actividad neuralizante provenía del organizador e indujo al ectodermo a convertirse en neural. La actividad posteriorizante se originaba en la parte posterior del embrión y disminuía hacia anterior. Estudios recientes han extendido este modelo y han propuesto candidatos para las moléculas neuralizantes y posteriorizantes. Como se había predicho, los dos sistemas de señales –neuralizante y posteriorizante– funcionan de manera independiente (Kolm y Sive 1997).

La proteína primaria involucrada en la posteriorización del tubo neural se piensa que es un miembro de la familia de los factores paracrinos de Wnt, muy probablemente Xwnt8 (Domingos y col. 2001; Kiecker y Niehrs 2001). En embriones de *Xenopus*, un gradiente endógeno de las señales de Wnt y de β-catenina es más elevado en la parte posterior y está ausente en la parte anterior (fig. 10-42A). Además, si Xwnt8 es agregado a los embriones en desarrollo, neuronas parecidas a las de la médula espinal son vistas en posiciones más anteriores en el embrión y los marcadores más anteriores del cerebro anterior están ausentes. Por el contrario, la supresión de la señal de Wnt (mediante el agregado de Frzb o de Dickkopf al embrión en desarrollo) conduce a la expresión de más células neurales con los marcadores más anteriores (fig. 10-42B-D). Por esta razón, mientras que el gradiente de BMP especifica el eje dorsoventral del embrión de rana e induce a las células a convertirse en neurales, el gradiente de Wnt podría del mismo modo especificar el eje anteroposterior.

SITIO WEB 10.10 **Especificación regional (Regional specification).** La investigación sobre especificación regional ha sido un esfuerzo fascinante que involucró a científicos de todas partes del mundo. Antes de que la biología molecular haya dado las herramientas para sacar a la luz a las proteínas morfogenéticas, los embriólogos desarrollaron ingeniosas maneras de averiguar qué era lo que esas proteínas estaban haciendo.

Mientras que las proteínas Wnt probablemente juegan un papel principal en la especificación del eje anteroposterior, es posible que no sean el único agente involucrado. Los factores de crecimiento de fibroblastos parecen ser críticos en permitir a las células responder a las señal de Wnt (Domingos y col. 2001). El ácido retinoico también

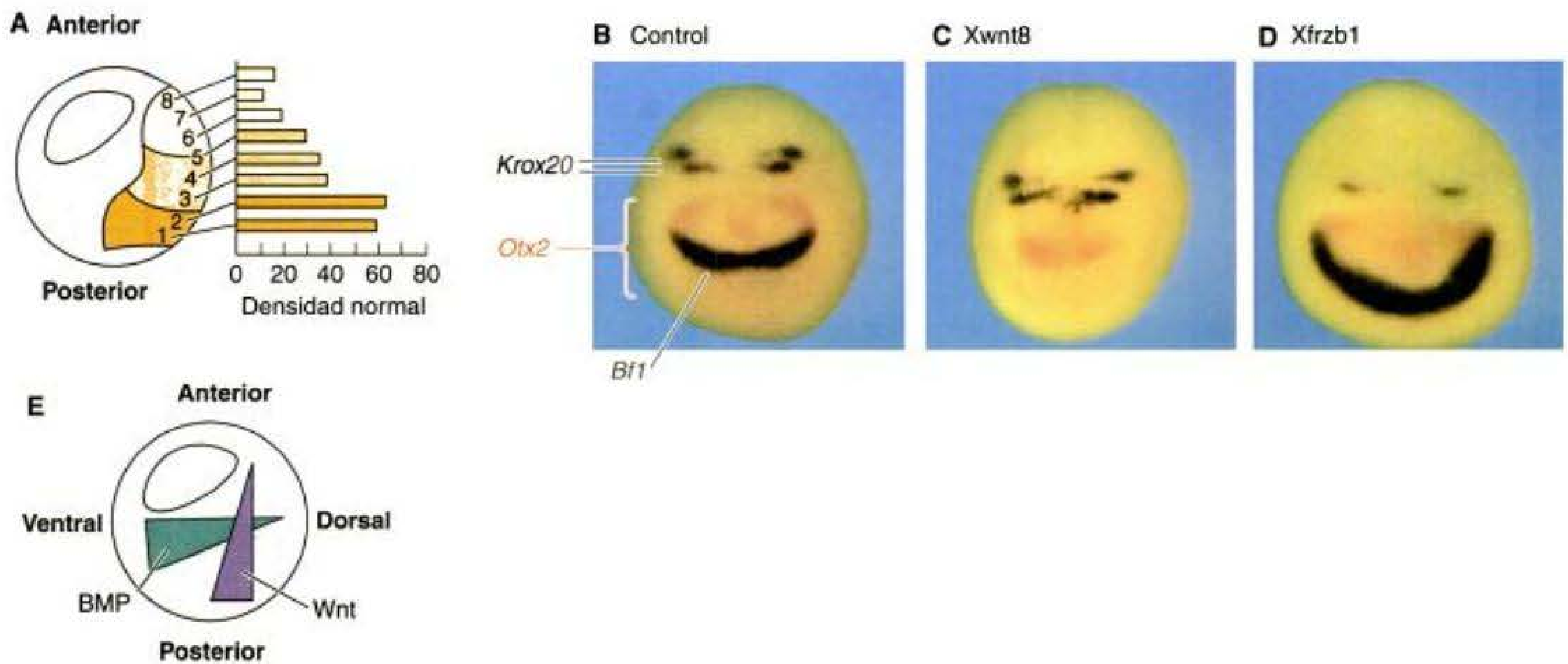


Fig. 10-42. Vía de señalización de Wnt y posteriorización del tubo neural. **A.** Gradiente de β-catenina en la placa neural presuntiva durante la gastrulación. Los embriones gastrulando fueron teñidos para β-catenina y la densidad de la tinción fue comparada entre regiones de las células ectodérmicas. **B-D.** Cuando se cambia el nivel de señalización de Wnt cambia la expresión de marcadores regionalmente específicos. En la néurula control (B) *Bf1* marca a las células neurales del cerebro anterior y es el marcador más anterior. El gen *Otx2* es expresado en el cerebro anterior y en el cerebro medio (rojo) y el gen *Krox20* es expresado en dos regiones del cerebro posterior (rombencéfalo). **C.** Microinyección de plásmidos que producen más Xwnt8 causa la posteriorización de la placa neural: la desaparición de la banda de expresión de *Bf1* y la reducción de la expresión de *Otx2* a su región del cerebro medio. **D.** La microinyección de plásmidos que producen Xfrzb1 (*Xenopus* Frzb, un antagonista de Wnt) anterioriza la placa neural y causa la expansión de las regiones de expresión de *Bf1* y de *Otx2* a expensas de las regiones más posteriores. **E.** Modelo por el cual un gradiente de expresión de BMP especifica el eje dorsoventral de la rana, mientras que un gradiente de proteínas Wnt especifica el eje anteroposterior. (Según Kiecker y Niehrs 2001.)

ha sido hallado a modo de gradiente siendo más elevado en el extremo posterior de la placa neural y éste además puede posteriorizar al tubo neural de un modo dependiente de concentración (Cho y De Robertis 1990; Sive y Cheng 1991; Chen y col. 1994). Las señales de ácido retinoico parecen ser especialmente importantes en el establecimiento del patrón del cerebro posterior (rombencéfalo), pero no en la del cerebro anterior (Blumberg y col. 1997; Kolm y col. 1997; Dupé y Lumsden 2001).

Las proteínas transformantes anteriores: factores de crecimiento tipo insulina

Además de las proteínas que bloquean las señales de BMP y Wnt en la cabeza, hay una señal *positiva* que estimula el desarrollo anterior de la cabeza. Estudios recientes por Pera y colegas (2001) sugieren que los **factores de crecimiento tipo insulina** (**IGF**; del inglés, *insulin-like growth factors*) son requeridos para formar el tubo neural anterior con su cerebro y placodas sensoriales. Los IGF se acumulan en la línea media dorsal y son especialmente importantes en el tubo neural anterior (fig. 10-43A). Además, los IGF son capaces de convertir al tejido del tronco inducido por Cordina en tejido anterior. Cuando se inyecta mRNA de IGF en blastómeras mesodérmicas ventrales se provoca la formación de cabezas ectópicas, mientras que el bloqueo del receptor de IGF resulta en la ausencia de la formación de la cabeza (fig. 10-43B-E). Cuando tales inhibidores de la señal de IGF fueron agregados a estos embriones, los marcadores celulares neurales anteriores (como Otx2) fueron abolidos casi completamente.

Entonces parece que la inhibición de la señal de BMP4 hace que las células se conviertan en tubo neural, pero sus destinos a lo largo del eje anteroposterior dependen de sus posiciones relativas a los ejes de Wnt. Las células en la región de la cabeza son protegidas contra la señal de Wnt y están destinadas a llegar a ser cerebro y células neurales tipo placoda. La finalización de esta determinación parece deberse a los factores de crecimiento tipo insulina que actúan dentro del tubo neural. El modelo básico de inducción neural, entonces se parece al esquema de la figura 10-44.

Especificación del eje izquierda-derecha

Aunque el renacuajo en desarrollo parece simétrico desde el exterior, hay varios órganos internos, como el corazón y el tubo digestivo, que no están equilibrados de manera uniforme sobre los lados izquierdo y derecho. En otras palabras, además de sus ejes dorsoventral y anteroposterior, el embrión tiene un eje izquierda-derecha. De algún modo, al cuerpo se le deben dar las claves sobre cuál mitad es derecha y cuál es izquierda.

En todos los vertebrados estudiados hasta ahora, el acontecimiento crítico en la formación del eje izquierda-derecha es la expresión del gen *nodal* en el mesodermo de la placa lateral sobre el lado *izquierdo* del embrión. En *Xenopus*, este gen es *Xnr1* (*Xenopus relacionado con nodal-1*). Si se permite que la expresión de este gen se produzca sobre el lado derecho, la posición del corazón (que normalmente es sobre el lado izquierdo) y la rotación del tubo digestivo son azarosas.

Fig. 10-43. Los factores de crecimiento tipo insulina potencian el desarrollo neural anterior. **A.** Patrón de expresión de IGF3, que muestra su acumulación en el tubo neural anterior. **B.** Estructura ectópica similar a la cabeza (completa con ojos y glándula de cemento) formada cuando el mRNA de *Igf2* fue inyectado en las blastómeras de la zona marginal ventral. **C.** Sección a través del embrión de **B**, que muestra un cerebro secundario y placodas nasales. Compárese con **D. D.** Sección a través de una larva de salamandra con un cerebro anterior extra, producido mediante la implantación en el blastocele de medula ósea de un cobayo de Guinea. **E.** Extremo anterior de un renacuajo control de 3 días. **F.** Extremo anterior de un renacuajo cuyas 4 blastómeras fueron inyectadas con un inhibidor de la señal de IGF. La glándula de cemento y los ojos están ausentes. (**A–C, E, F,** de Pera y col. 2001; fotografías cortesía de E. M. De Robertis. **D,** de Toivonen 1938.)

Pero ¿qué causa la expresión de *Xnr1* únicamente sobre el lado izquierdo? En *Xenopus*, es posible que la primera señal sea dada en la fecundación. Los microtúbulos involucrados en la rotación citoplasmática parecen ser críticos, debido a que si se inhibe su formación, no aparece el eje izquierda-derecha (Yost 1998). Además, la proteína Vg1, que parece expresarse en todo el hemisferio vegetal, parece ser procesada a su forma activa predominantemente sobre el lado izquierdo del embrión. La inyección de la proteína Vg1 en las blastómeras vegetales izquierdas no tiene efecto, pero el agregado de ésta a las blastómeras vegetales de la derecha conduce a la expresión de *Xnr1* en las placas laterales derecha e izquierda y a las posiciones al azar del corazón y del intestino (Hyatt y col. 1996; Kramer y Yost 2002). Además, cuando la proteína Vg1 activa es inyectada en una blastómera vegetal particular del lado derecho (la tercera célula vegetal a la derecha de la línea media dorsal), el eje derecha-izquierda es invertido en su totalidad. Ningún otro miembro de la familia de TGF-β es capaz de llevar a cabo es-

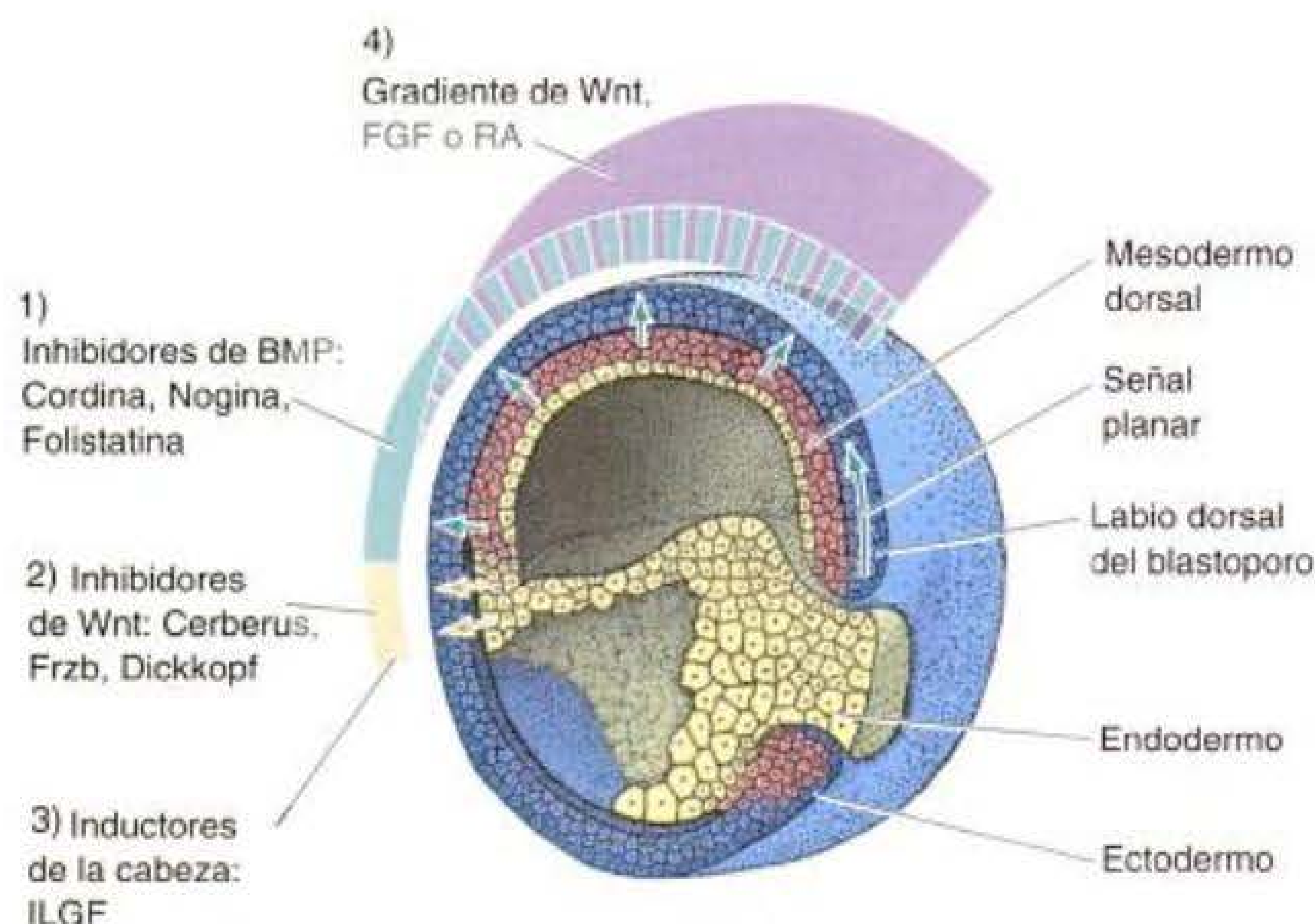


Fig. 10-44. Modelo de la función del organizador y especificación de ejes en la gástrula de *Xenopus*. 1) Los inhibidores de BMP desde el tejido organizador (mesodermo dorsal y mesendodermo faríngeo) bloquean la formación de la epidermis, del mesodermo ventrolateral y del endodermo ventrolateral. 2) Los inhibidores de Wnt en la parte anterior del organizador (mesendodermo faríngeo) permiten la inducción de estructuras de la cabeza. 3) Las estructuras de la cabeza son inducidas a través de la señalización del factor de crecimiento tipo insulina. 4) Un gradiente de factores caudalizantes (Wnts, ácido retinoico) causa la expresión regional de los genes Hox y especifica las regiones del tubo neural.

ta inversión (Hyatt y Yost 1998). No se sabe todavía cómo los acontecimientos de la fecundación conducen a la expresión de *Xnr1* en el mesodermo de la placa lateral izquierda durante la gastrulación.

La vía por la cual la proteína Xnr1 instruye al corazón y al intestino a plegarse apropiadamente es desconocida, pero uno de los genes claves activados por Xnr1 parece ser ***pitx2***. Debido a que *pitx2* es activado por Xnr1, éste es expresado normalmente solo sobre el lado izquierdo del embrión. Sin embargo, si la proteína Pitx2 es inyectada en el lado derecho, también la posición del corazón y la rotación intestino se tornan azarosas (fig. 10-45; Ryan y col. 1998). Pitx2 persiste sobre el lado izquierdo del embrión a medida que se desarrollan el corazón y el intestino, y controla sus respectivas posiciones. Pitx2 puede estar en "el corazón del corazón" (Strauss 1998).

Finalmente se están poniendo nombres a los "agentes" y "factores solubles" de los embriólogos experimentales. Además finalmente se están definiendo las vías o rutas intercelulares de los factores paracrinos y de los factores de transcripción que constituyen las primeras etapas de la organogénesis. El programa de investigación internacional iniciado por el laboratorio de Spemann en 1920 está acercándose hacia una conclusión. Pero esta investigación ha tenido niveles de complejidad más profundos de los que Spemann había concebido y justo cuando los experimentos de Spemann decían cuánto no sabemos, hoy se está frente a un completo nuevo grupo de problemas generados por las soluciones a los antiguos.

Cuando analizaba el campo en 1927, Spemann comentó

> *Aún nos encontramos ante enigmas, pero con la esperanza de solucionarlos. Y enigmas con la esperanza de solución; ¿qué más desea un científico?*

El desafío todavía se mantiene.

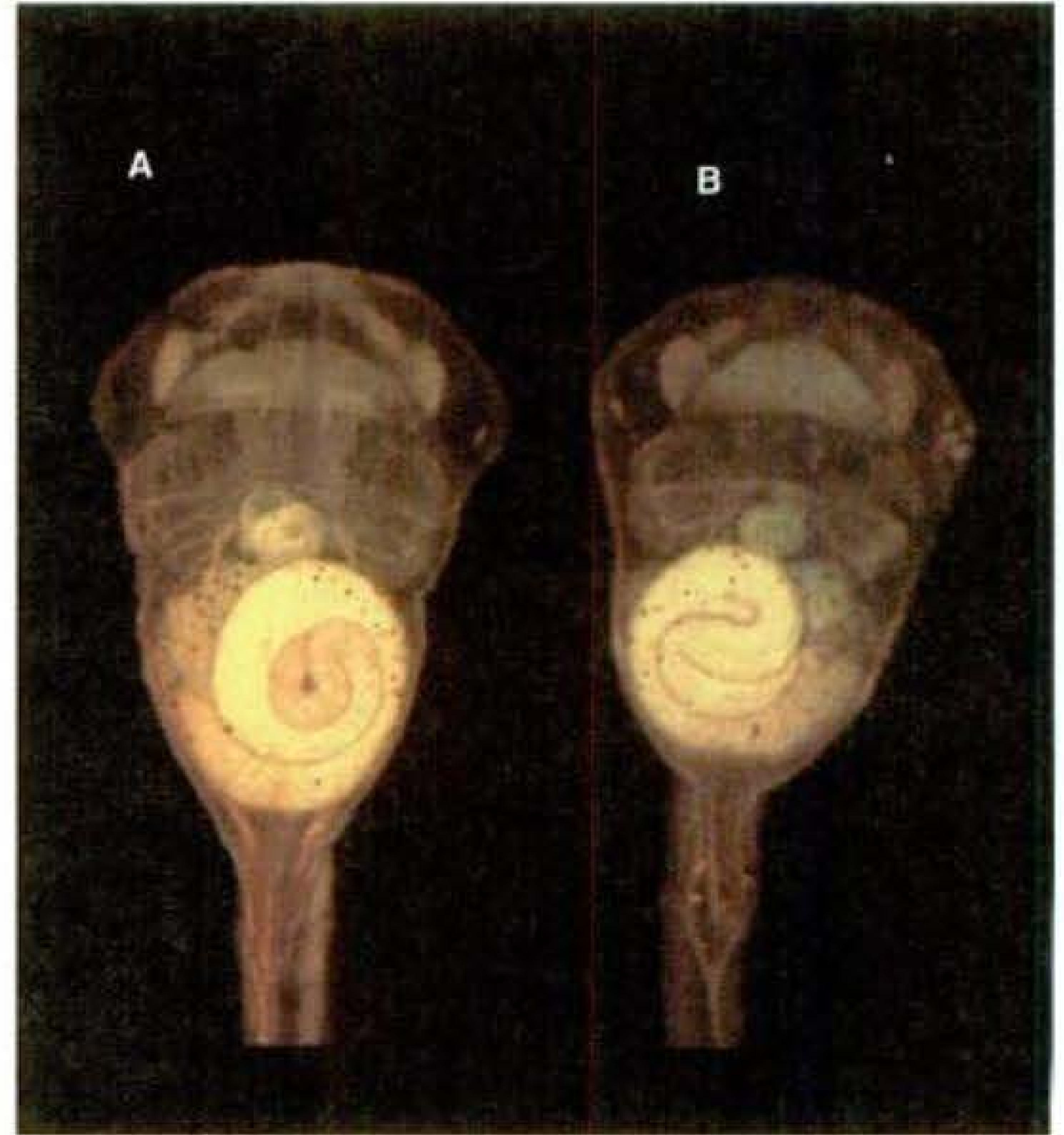


Fig. 10-45. Pitx2 determina la dirección del asa cardíaca y de la rotación del tubo digestivo. **A.** Renacuajos tipo salvaje de *Xenopus* vistos desde el lado ventral, que muestran el asa cardíaca hacia la derecha y la rotación intestinal en sentido antihorario. **B.** Si un embrión es inyectado con Pitx2 de modo que su proteína está presente en el mesodermo de los lados derecho e izquierdo (en lugar de solo el lado izquierdo), la orientación del asa cardíaca y la rotación del intestino se producen al azar uno con respecto al otro. A veces este tratamiento da como resultado una reversión completa, como en este embrión, en el que las asas del corazón están a la izquierda y el intestino rota en sentido horario. (De Ryan y col. 1998; fotografía cortesía de J. C. Izpisúa-Belmonte.)

Resumen: desarrollo temprano y formación del eje en los anfibios

1. La segmentación en los anfibios es holoblástica, pero es desigual debido a la presencia de vitelo en el hemisferio vegetal.
2. La gastrulación en los anfibios comienza con la invaginación de las células de botella, seguida por la involución coordinada del mesodermo y la epibolia del ectodermo. La rotación vegetal desempeña un papel significativo en dirigir la involución.
3. Las fuerzas que dirigen la epibolia y la extensión convergente del mesodermo son los acontecimientos de intercalación en los que confluyen varias capas de tejido. La fibronectina cumple un papel crítico en permitir a las células mesodérmicas migrar hacia el embrión.
4. El labio dorsal del blastoporo forma el tejido organizador de la gástrula de los anfibios. Este tejido dorsaliza al ectodermo, lo transforma en tejido neural y éste transforma al mesodermo ventral en mesodermo lateral.
5. El organizador consiste en tejidos de endodermo faríngeo, mesodermo de la cabeza, notocorda y labio dorsal del blastoporo. El organizador funciona secretando proteínas (Nogina, Cordina y Folistatina) que bloquean la señal de BMP que de otro modo ventralizaría al mesodermo y activaría a los genes epidérmicos en el ectodermo.
6. El organizador es autoinducido por el centro de Nieuwkoop, localizado en las células vegetales más dorsales. Este centro se forma por la rotación cortical durante la fecundación, que transloca la proteína Dishevelled hacia el lado dorsal del cigoto.
7. La proteína Dishevelled estabiliza a la β-catenina sobre las células del lado dorsal del embrión. Por lo tanto, el centro de Nieuwkoop se forma por la acumulación de β-catenina, que puede formar un complejo con Tcf3 para formar un complejo de factor de transcripción que puede activar la transcripción del gen *siamois*.

8. La proteína Siamois y una señal TGF-β (quizá de Vg1) pueden activar al gen *goosecoid* en el organizador. El gen *goosecoid* puede activar a otros genes que causan la función del organizador.
9. En la región de la cabeza, un grupo adicional de proteínas (Cerberus, Frzb, Dickkopf) bloquea la señal de Wnt desde el mesodermo ventral y lateral.
10. La señal de Wnt causa un gradiente de β-catenina a lo largo del eje anteroposterior de la placa neural. Esta señal graduada parece especificar la regionalización del tubo neural.
11. Factores de crecimiento tipo insulina parecen transformar el tubo neural en tejido anterior (cerebro anterior).
12. El eje izquierda-derecha parece iniciarse en la fecundación a través de la proteína Vg1. De un modo todavía desconocido, esta proteína activa a la proteína Nodal solamente sobre el lado izquierdo del cuerpo. En *Xenopus*, como en otros vertebrados, la proteína Nodal activa la expresión de Pitx2, que es crítica para distinguir el lado derecho del lado izquierdo en los tubos cardíacos y digestivo.

Bibliografía citada

Agius, E., M. Oelgeschlaager, O. Wessely, C. Kemp and E. M. De Robertis. 2000. Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in Xenopus. Development 127: 1151-1159.

Alfandari, D., C. A. WhiKaker, D. W. DeSimone and T. Darribere. 1995. Integrin α_5 subunit is expressed on mesodermal cell surfaces during amphibian gastrulation. Dev. Biol. 170: 249-261.

Appel, T. A. 1987. The Cuvier-Geoffroy Debate: French Biology in the Decades before Darwin. Oxford University Press, New York.

Arendt, D. and K. Nubler-Jung. 1999. Rearranging gastrulation in the name of yolk: Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. Mech. Dev. 81: 3-22.

Balinsky, B. I. 1975. Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Beams, H. W. and R. G. Kessel. 1976. Cytokinesis: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells. Am. Sci. 64: 279-290.

Bïjtel, J. H. 1931. Über die Entwicklung des Schwanzes bei Amphibien. Wilhelm Roux Arch Entwicklungsmech. Org. 125: 448-486.

Black, S. D. and J. Gerhart. 1985. Experimental control of the site of embryonic axis formation in Xenopus laevis eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. 108: 310-324.

Black, S. D. and J. Gerhart. 1986. High frequency twinning of Xenopus laevis embryos from eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. 116: 228-240.

Blitz, I. L. and K. W. Y. Cho. 1995. Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: The role of the Xenopus homeobox gene orthodenhcle. Development 121: 993-1004.

Blumberg, B., J. Bolado, T. Moreno, C. Kintner, R. Evans and N. Papalopulu. 1997. An essential role for signaling in anteroposterior neural patterning. Development 124: 373-379.

Boucaut, I.-C., T. D'Arribere, T. J. Poole, H. Aoyama, K. M. Yamada and J.-P. Thiery. 1984. Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: A competitive peptide inhibition of fibronectin function inhibits astrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. J. Cell. Biol. 99: 1822-1830.

Boucaut, J.-C., T. D'Arribere, S. D. Li, H. Boulekbache, K. M. Yamada and J.-P. Thiery. 1985. Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. J. Embryol. Exp. Morphol. 89 [Suppl.]: 211-217.

Bouwmeester, T., S.-H. Kim, Y. Sasai, B. Lu and E. M. De Robertis. 1996. Cerberus is a head-inducing se"eted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. Nature 382: 595-601.

Brannon, M. and D. Kimelman. 1996. Activation of siamois by the Wnt pathway. Dev. Biol. 180: 344-347.

Brannon, M., M. Gomperts, L. Sumoy, R. T. Moon and D. Kimelman.1997. β-catenin /XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. Genes Dev 11: 2359-2370.

Capuron, A. 1968. Marquage autoradiographique et conditions de l'organogenese générale d'embryons induits par de la greffe de la levre dorsale du blastopore chez l'amphibien urodele Pkurodeles waltii Michah. Ann. Embryol. Morphol. 1: 271-293.

Carlson, B. M. 1981. Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Chen, Y. P., L. Huang and M. Solursh. 1994. A concentration gradient of retinoids in the early Xenopus laevis embryo. Dev. Biol. 161: 70-76.

Cho, K.W. and De Robertis, E. M. 1990. Differential activation of Xenopus homeobox genes by mesoderm-inducing growth factors and retinoic acid. Genes Dev. 4: 1910-1916.

Cho, K. W. Y., B. Blumberg, H. Steinbeisser and De Robertis. 1991a. Molecular nature of Spemann's organizer: The role of the Xenopus homeobox gene goosecoid. Cell 67:1111-1120.

Cho, K. W. Y., A. A. Morita, C. V. E. Wright and E. M. De Robertis. 1991b. Overexpression of a homeodomain protein confers axis-forming activity to uncommitted Xenopus embryonic cells. Cell 65: 55-64.

Christian, J. L. and R. T. Moon. 1993. Interactions between Xwnt8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of Xenopus. Genes Dev. 7: 13-28.

Cooke, J. 1986. Permanent distortion of positional system of Xenopus embryo by brief early perturbation in gravity. Nature 319: 60-63.

Dale, L. and J. M. W. Slack.1987. Regional specificity within the mesoderm of early embryos of Xenopus laevis. Development 100: 279-295.

Dale, L., G. Howes, B. M. J. Price and J. C. Smith. 1992. Bone morphogenetic protein 4: A ventralizing factor in early Xenopus development. Development 115: 573-585.

Darribere, T., K. M. Yamada, K. E. Johnson and J.-C. Boucaut. 1988. The 140-kD fibronectin receptor complex is required for mesodermal cell adhesion during gas-

trulation in the amphibian Pleurodeles waltii. Dev Biol. 126: 182-194.

Darribere, T., K. Guida, H. Larjava, K. E. Johnson, K. M. Yamada, J.-P. Thiery and J.-C. Boucaut. 1990. In vivo analysis of integrin β1 subunit function in fibronectin matrix assembly. J. Cell. Biol. 110: 1813-1823.

Davidson, L. A., B. G. Hoffstrom, R. Keller and D. W. DeSimone.2002. Mesendoderm extension and mantle closure in Xenopus laevis gastrulation: Combined roles for integrin α5β1, fibronectin, and tissue geometry. Dev. Biol. 242: 109-129.

De Robertis, E. M. and J Aréchaga (eds.). 2001. The Spemann-Mangold Organizer: 75 Years On. Int. J. Dev. Biol. 45 (1) (Special Issue).

De Robertis, E. M. and Y. Sasai. 1996. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. Nature 380: 37-40.

De Robertis, E. M., M. Blum, C. Niehrs and H. Steinbeisser. 1992. Goosecoid and the organizer. Development 1992 [Suppl.]: 167-171.

De Robertis, E. M., J. Larraín, M. Oelgeschlander and O. Wessley. 2000. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. Nature Rev. Genet. 1: 171-181.

Dixon, J. E. and C. R. Kintner. 1989. Cellular contacts required for neural induction in Xenopus laevis embryos: Evidence for two signals. Development 106: 749-757.

Domingos, P. M., N. Itasaki, C. M. Jones, S. Mercurio, M. G. Sargent, J. C. Smith and R. Krumlauf 2001. The Wnt/β-catenin pathway posteriorizes neural tissue in Xenopus by an indirect mechanism requiring FGF signalling. Dev. Biol. 239: 148-160.

Doniach, T. 1993. Planar and vertical induction of anteroposterior pattern during the development of the amphibian central nervous system. J. Neurobiol. 24: 1256-1275.

Dosch, R., V. Gawantka, H. Delius, C. Blumenstock and C. Niehrs. 1997. BMP-4 acts as a morphogen in dorsolateral mesoderm patterning in Xenopus. Development 124: 2325-2334.

Dupé, V. and A. Lumsden. 2001. Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. Development 128: 2199-2208.

Engleka, M. J. and D. S. Kessler. 2001. Siamois cooperates with TGF signals to induce the complete function of the Spemann-Mangold Organizer. Int. J. Dev. Biol. 45: 241-250.

Ewald, A.J., H. McBride, M. Reddington, S. E. Fraser and R. Kerschmann. 2002. Surface imaging microscopy: An automated method for visualizing whole embryo samples in three dimensions at high resolution. Dev. Dynam. 225: 369-375.

Fan, C.-M. and S. Y. Sokol. 1997. A role for Siamois in Spemann organizer formation. Development 124: 2581-2589.

Fassler, P. E. and K. Sander. 1996. Hilde Mangold (1898-1924) and Spemann's organizer: Achievement and tragedy. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 205: 323-332.

Funayama, N., F. Fagotto, P. McCrea and B. M. Grumbiner. 1995. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of β-catenin: Evidence for intracellular signalling. J. Cell Biol. 128: 959-968.

Gamse, J. and H. Sive. 2000. Vertebrate anteroposterior patterning: The Xenopus neurectoderm as a paradigm. BioEssays 22: 976-986.

Gawantka, V., H. Delius, K. Hirschfeld, C. Blumenstock and C. Niehrs. 1995. Antagonizing the Spemann organizer: Role of the homeobox gene Xvent-1. EMBO J. 14: 6268-6279.

Geoffroy Saint-Hilaire, E. 1822. Considérations génerales sur la vertebre. Mém. Mus. His. Nat. 9: 89-1110.

Gerhart, J., G. Ubbels, S. Black, K. Hara and M. Kirschner. 1981. A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in Xenopus laevis. Nature 292: 511-516.

Gerhart, J. and 7 others. 1986. Amphibian early development. BioScience 36: 541-549.

Gerhart, J. C., M. Danilchik, T. Doniach, S. Roberts, B. Rowning, and R.Stewart. 1989. Cortical rotation of the Xenopus egg: Consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. Development [Suppl.] 107: 37-51.

Gilbert, S. F. and J. A. Bolker. 2001. Homologies of process and modular elements of embryonic construction. J. Exp. Zool. 291: 1-12.

Gilbert, S. F. and L. Saxén. 1993. Spemann's organizer: Models and molecules. Mech. Dev. 41: 73-89.

Gimlich, R. L. 1985. Cytoplasmic localization and chordamesoderm induction in the frog embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 89: 89-111.

Gimlich, R. L.1986. Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the Xenopus embryo. Dev. Biol. 116: 340-352.

Gimlich, R. L. and J. C. Gerhart. 1984. Early cellular interactions promote embryonic axis formation in Xenopus laevis. Dev. Biol. 104: 117-130.

Glavic, A., J. L. Gomez-Skarmeta and R. Mayor. 2001. Xiro-l controls mesoderm patterning by repressing bmp-4 expression in the Spemann organizer. Dev. Dyn. 222: 368-376.

Glinka, A., W. Wu, D. Onichtchouk, C. Blumenstock and C. Niehrs.1997. Head induction by simultaneous repression of BMP and Wnt signalling in Xenopus. Nature 389: 517-519.

Glinka, A., W. Wu, A. P. Monaghan, C. Blumenstock and C. Niehrs. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. Nature 391: 357- 362.

Godsave, S. F. and J. M. W. Slack. 1989. Clonal analysis of mesoderm induction in Xenopus. Dev. Biol. 134: 486-490.

Gont, L. K., H. Steinbeisser, B. Blumberg and E. M. De Robertis. 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: The multiple tail populations of the Xenopus tailbud derive from the late blastopore lip. Development 119: 991-1004.

Graff, J. M., R. S. Thies, J. J. Song, A. J. Celeste and D. A. Melton. 1994. Studies with a Xenopus BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo. Cell 79: 169-179.

Grunz, H. 1997. Neural induction in amphibians. Curr. Topics Dev. Biol. 35: 191-228.

Grunz, H. and L. Tacke. 1989. Neural differentiation of Xenopus laevis ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducers. Cell. Diff Dev. 32: 117-124.

Guger, K. A. and B. M. Gumbiner. 1995. β-catenin has wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in Xenopus dorsal-ventral patterning. Dev. Biol. 172: 115-125.

Hamburger, V. 1984. Hilde Mangold, codiscoverer of the organizer. J. Hist. Biol. 17: 1-11.

Hamburger V. 1988. The Heritage of Experimental Embryology: Hans Spemann and the Organizer. Oxford University Press, Oxford.

Hammerschmidt, M., G. N. Serbedzija and A. P. McMahon. 1996. Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: Requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. Genes Dev 10: 2452-2461.

Hansen, C. S., C. D. Marion, K. Steele, S. George and W. C. Smith. 1997. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm formation and epidermis inducers by Xnr3. Development 124: 483-492.

Hara, K. 1977. The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 181: 73-87.

Hardin, J. D. and R. Keller. 1988. The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of Xenopus laevis. Development 103: 211-230.

Hawley, S. H. B., K. Wunnenberg-Stapleton, C. Hashimoto, M. N. Laurent, T. Watabe, B. W. Blumberg and K. W. Y. Cho. 1995. Disruption of BMP signals in embryonic Xenopus ectoderm leads to direct neural induction. Genes Dev. 9: 2923-2935.

He, X., J.-P. Saint-Jeannet, J. R. Woodgett, H. E. Varmus and I. B. Dawid. 1995. Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in Xenopus embryos. Nature 374: 617-622.

Heasman, J. M. and 8 others. 1994a. Overexpression of cadherins and underexpression of β-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos. Cell 79: 791-803.

Heasman, J., D. Ginsberg, K. Goldstone, T. Pratt C. Yoshidanaro and C. Wylie. 1994b. A functional test for maternally inherited cadherin in Xenopus shows its importance in cell adhesion at the blastula stage. Development 120: 49-57.

Hemmati-Brivanlou, A. and D. A. Melton. 1992. A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in Xenopus embryos. Nature 359: 609-614.

Hemmati-Brivanlou, A. and D. A. Melton. 1994. Inhibition of activin signalling promotes neuralization in Xenopus. Cell 77: 273-281.

Hemmati-Brivanlou A. and D. A. Melton. 1997. Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. Cell 88: 13-17.

Hemmati-Brivanlou, A. and G. H. Thomsen. 1995. Ventral mesodermal patterning in Xenopus embryos: Expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. Dev. Genet. 17: 78-810.

Hirsch, N., L. B. Zimmerman and R. M. Grainger. 2002. Xenopus, the ne% generation: X tropicalis genetics and genomics. Dev. Dynam. 225: 422-433.

Holley, S. A., P. D. Jackson, Y. Sasai, B. Lu, E. M. De Robertis, F. M. Hoffmann and E. L. Ferguson.1995. A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. Nature 376: 249-253.

Holowacz, T. and R. P. Elinson. 1993. Cortical cytoplasm, which induces dorsal axis formation in Xenopus, is inactivated by W irradiation of the oocyte. Development 119: 277-285.

Holtfreter, H. 1933. Die totale Exogastrulation, eine Selbststablosung des Ektoderms von Entomesoderm. Entwicklung und funktionelles Verhalten nervenloser Organe. Arch. Entwick. Mech. Org. 129: 669-793.

Holtfreter, J. 1943. A study of the mechanics of gastrulation, Part I. J. Exp. Zool. 94: 261-318.

Holtfreter, J. 1944. A study of the mechanics of astrulation, Part II. J. Exp. Zool. 95: 171-212.

Hyatt, B. A. and H. J. Yost. 1998. The left/right coordinator: The role of Vgl in organizing left-right axis formation. Cell 93: 37-46.

Hyatt, B. A., J. L. Lohr and H. J. Yost. 1996. Initiation of vertebrate left-right axis by maternal Vg1. Nature 384: 62-65.

Ibrahim, H. and R. Winklbauer. 2001. Mechanisms of mesendoderm internalization in Xenopus gastrula: Lessons from the vegetal side. Dev. Biol. 240: 108-122.

Iemura, S.-I. and 7 others. 1998. Direct binding of follistatin to a complex of bone morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9337-9342.

Iwabuchi, M., K. Ohsumi, T. M. Yamamoto and T. Kishimoto. 2002. Coordinated regulation of M phase exit and S phase entry by the Cdc2 activity level in the early embryonic cell cycle. Dev. Biol 243: 34-43.

Jares, P. and J. J. Blow.2000. Xenopus Cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. Genes Dev. 14: 1528-1540.

Jones, C. M., K. M. Lyons, P. M. Lapan, C. V. E. Wright and B. L. M. Hogan. 1992. DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior ventralizing factor in Xenopus mesoderm induction. Development 115: 639-647.

Joseph, E. M. and D. A. Melton. 1998. Mutant Vgl ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in Xenopus embryos. Development 125: 2677-2685.

Kalt, M. R. 1971. The relationship between cleavage and blastocoel formation in Xenopus laevis. 1. Light microscopic observations. J. Embryol. Exp. Morphol. 26: 37-410.

Keller, R. E. 1975. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. Dev. Biol. 42: 222-241.

Keller, R. E. 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. Dev. Biol. 51: 118-137.

Keller, R. E. 1980. The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep cell rearrangement during gastrulation of Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morphol. 60: 201-243.

Keller, R. E. 1981. An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in the gastrulation of Xenopus laevis. J. Exp. Zool. 216: 81-101.

Keller, R. E. 1986. The cellular basis of amphibian gastrulation. In L. Browder (ed.), Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis, Vol. 2. Plenum, New York, pp. 241-327.

Keller, R. and M. Danikhik. 1988. Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of Xenopus laevis. Development 103: 193-209.

Keller, R. E. and G. C. Schoenwolf. 1977. An SEM study of cellular morphology, contact, and arrangement as related to gastrulation in Xenopus laevis. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 182: 165-186.

Kessler, D. S. 1997. Siamois is required for formation of Spemann's organizer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13017-13022.

Kiecker, C. and C. Niehrs. 2001. A morphogen gradient of Wnt/-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. Development 128: 4189-4201.

Kim, S.-H., A. Yamamoto, T. Bouwmeester, E. Leyns, L., T. Bouwmeester, S Agius and E. M. De Robertis. 1998. The role of and E. M. De Robertis. 1997. paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during Xenopus gastrulation. Development 125: 4681-4691.

Kolm, P. J. and H. L. Sive. 1997. Retinoids and posterior neural induction: A reevaluation of Nieuwkoop's two-step hypothesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 62: 511-521.

Kolm, P. J., V. Apekin and H. Sive. 1997. Xenopus hindbrain patterning requires retinoic acid signaling. Dev. Biol. 192: 1-16.

Kramer, K. L. and H. J. Yost. 2002. Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous Vg1 cofactor. Dev. Cell 2: 115-124.

Rumano, G. and W. C. Smith. 2002. Revisions to the Xenopus gastrula fate map: implications for mesoderm induction and patterning. Dev. Dynam. 225: 409-421.

Kurata, T., J. Nakabayashi, T. S. Yamamoto, M. Mochii and N. Ueno. 2000. Visualization of endogenous BMP signaling during Xenopus development. Differentiation 67: 33-40.

Landstrom, U. and S. Løvtrup. 1979. Fate maps and cell differentiation in the amphibian embryo: An experimental study. J. Embryol. Exp. Morphol. 54: 113-130.

Lane, M. C. and W. C. Smith. 1999. The origins of primitive blood in Xenopus: Implications for axial patterning. Development 126: 423-434.

Lane, M. C. and M. D. Sheets. 2002. Rethinking axial patterning in amphibians. Dev. Dynam. 225: 434-447.

Larabell, C. A. and 7 others. 1997. Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos is presaged by early asymmetries in β-catenin which are modulated by the Wnt signaling pathway. J. Cell. Biol. 136: 1123-1136.

Latinkic, B. V., M. Umbhauer, K. A. Neal, W. krchner, J. C. Smith and V. Cunliffe. 1997. The Xenopus Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. Genes Dev. 11: 3265-3276.

Laurent, M. N., I. L. Blitz, C. Hashimoto, U. Rothbacher and K. W.-Y. Cho. 1997. The Xenopus homeobox gene twin mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer. Development 124: 4905-4916.

Lee, J. E., S. M. Hollenberg, L. Snider, D. L. Turner, N. Lipnick and H. Weintraub. 1995. Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. Science 268: 836-844.

Lemaire, P., N. Garrett and J. B. Gurdon. 1995. Expression doning of Siamois, a Xenopus homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. Cell 81: 85-94

Leyns L., T. Bouwmeester, S.-H. Kim, S. Piccolo and E. M. De Robertis. 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. Cell 88: 747-756.

London, C., R. Akers and C. Phillips. 1988. Expression of Epi-1, an epidermis-specific marker in Xenopus laevis embryos, is specified prior to gastrulation. Dev. Biol. 129: 380-389.

Løvtrup, S. 1975. Fate maps and gastrulation in amphibia: A critique of current views. Can. J. Zool. 53: 473-479.

Ma, Q. F., C. Kintner and D. J. Anderson. 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. Cell 87: 43-52.

Mangold, O.1933. Über die Induktionsfahigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwissenschaften 21: 761-766.

Mao, B., W. Wu, D. Hoope, P. Stannek, A. Glinka and C. Niehrs. 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. Nature 411: 321-325.

Mao, B. W. and 11 others. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/-catenin signalling. Nature 417: 664-667.

Mariani, F. and R. Harland. 1998. XBF-2 is a transcriptional repressor that converts ectoderm into neural tissue. Development 125: 5019-5031.

Marsden, M. and D. W. DeSimeone. 2001. Regulation of cell polarity, radial intercalation, and epiboly in Xenopus: Novel roles for integrin and fibronectin. Development 128: 3635-3647.

Miller, J. R., B. A. Rowning, C. A. Larabell, J. A. Yang-Snyder, R. L. Bates and R. T. Moon. 1999. Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of Dishevelled that is dependent on cortical rotation. J. Cell Biol. 146: 427-437.

Minsuk, S. B. and R. E. Keller. 1996. Dorsal mesoderm has a dual origin and forms by a novel mechanism in Hymenochirus, a relative of Xenopus. Dev. Biol. 174: 92-103.

Molenaar, M. and 8 others. 1996. Xtcf-3 transcription factor mediates β-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell 86: 391-399.

Moon, R. T. and D. Kimelman. 1998. From cortical rotation to organizer gene expression: Toward a molecular explanation of axis specification in Xenopus. BioEssays 20: 536-545.

Morgan, R. and 8 others. 1999. Calponin modulates the exclusion of Otx-expressing cells from convergence extension movements. Nature Cell Biol. 1: 404-408.

Nakamura, O. and H. Takasaki. 1970. Further studies on the differentiation capacity of the dorsal marginal zone in the morula of Triturus pyrrhogaster. Proc. Jpn. Acad. 46: 700-705.

Nakatsuji, N., M. A. Smolira and C. C. Wylie. 1985. Fibronectin visualized by scanning electron microscope immunocytochemistry on the Newman, C. S. and P. A. Krieg. 1999. Specification and differentiation of the heart in amphibia. In S. A. Moody, Cell Lineage and Fate Determination. Academic Press, New York, pp. 341-351.

Newport, J. W. and M. W. Kirschner. 1982a. A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell 30: 675-686.

Newport, J. W. and M. W. Kirschner. 1982b. A major developmental transition in early Xenopus embryos. II. Control of the onset of transcription. Cell 30: 687-696.

Niehrs, C., R. Keller, K. W. Y. Cho and E. M. De Robertis. 1993. The homeobox gene goosecoid controls cell migration in Xenopus embryos. Cell 72: 491-503.

Nieuwkoop, P. D. 1969. The formation of the mesoderm in urodele amphibians. I. Induction by the endoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmeeh. Org. 162: 341-373.

Nieuwkoop, P. D. 1973. The "organisation center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenetic action. Adv. Morphogenet. 10: 1-310.

Nieuwkoop, P. D. 1977. Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. Curr. Top. Dev. Biol. 11: 115-132.

Nieuwkoop, P. D. and P. A. Florschutz. 1950. Quelques caracterer spéciaux de le gastrulation et de la neurulation de l'oeuf de Xenopus laevis, Daud. et de quelques autres anoures. Arch. Biol. 61: 113-150

Northrop, J., A. Woods, R. Seger, A. Suzuki, N. Ueno, E. Krebs and D. Kimelman. 1995. BMP-4 regulates the dorsal-ventral differences in FGF/MAPRK-mediated mesoderm induction in Xenopus. Dev Biol. 172: 242-252.

Oelgeschlager, M., H. Kuroda, B. Reversade and E. M. de Robertis. 2003. Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in Xenopus embryos. Dev. Cell. In press.

Otte, A. P. and R. T. Moon. 1992. Protein kinase C isozymes have distinct roles in neural induction and competence in Xenopus. Cell 68: 1021-1029.

Pera, E. M., O. Wessely, S.-S. Li and E. M. De Robertis. 2001. Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. Dev. Cell 1: 655-665.

Piccolo, S., Y. Sasai, B. Lu and E. M. De Robertis. 1996. Dorsoventral patterning in Xenopus: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. Cell 86: 589-598.

Piccolo, S., E. Agius, L. Leyns, S. Bhattacharyya, H. Grunz, T. Bouwmeester and E. M. DeRobertis. 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP, and Wnt signals. Nature 397: 707-710.

Pierce, S. B. and D. Kimelman. 1995. Regulation of Spemann organizer formation by the intracellular kinase Xgsk-3. Development 121: 755-765.

Purcell, S. M. and R. Keller. 1993. A different type of amphibian mesoderm morphogenesis in Ceratophrys ornata. Development 117: 307-317.

Recanzone, G. and W. A. Harris. 1985. Demonstration of neural induction using nuclear markers in Xenopus. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 194: 344-354.

Ryan, A. and 14 others. 1998. Pitx2 determines left-right asymmetries in vertebrates. Nature 394: 54-55.

Saka, Y. and J. C. Smith. 2001. Spatial and temporal patterns of cell division during early Xenopus embryogenesis. Dev. Biol. 229: 307-318.

Sander, K. and P. Fassler. 2001. Introducing the Spemann-Mangold organizer: Experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. Int. J. Deu Biol. 45: 1-11.

Saneyoshi, T., S. Kume, Y. Amasaki and K. Mikoshiba. 2002. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. Nature 417: 295-299.

Sasai, Y. 1998. Identifying the missing links: Genes that connect neural induction and primary neurogenesis in vertebrates. Neuron 21:455-458.

Sasai, Y., B. Lu, H. Steinbeisser, D. Geissert, L. K. Gont and E. M. De Robertis. 1994. Xenopus chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. Cell 79: 779-790.

Sato, S. M. and T. D. Sargent. 1989. Development of neural inducing capacity in dissociated Xenopus embryos. Dev. Biol. 134: 263-366.

Savage, R. aud C. R Phillips. 1989. Signals from the dorsal blastopore lip region during gastrulation bias the ectoderm toward a nonepidermal pathway of differentiation in Xenopus laevis. Dev. Biol. 133: 157-168.

Saxén, L. 1961. Transfilter neural induction of amphibian ectoderm. Dev. Biol. 3: 140-152.

Saxén, L. 2001. Spemann's heritage in Finnish developmental biology. Int. J. Dev. Biol. 45: 51-55.

Saxén, L. and S. Toivonen. 1962. Embryonic Induction. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Schmidt, J., V. Francoise, E. Bier and D. Kimelman. 1995. Drosophila short gastrulation induces an ectopic axis in Xenopus: Evidence for conserved mechanisms of dorsoventral patterning. Development 121: 4319-4328.

Schneider, S., H. Steinbeisser, R. M. Warga and P. Hausen. 1996. β-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. Mech. Dev. 57: 191-198.

Shapira, E., K. Marom, V. Levy, R. Yelin and A. Fainsod. 2000. The Xvex-l antimorph reveals the temporal competence for organizer formation and an early role for ventral homeobox genes. Mech. Dev. 90: 77-87.

Sharpe, C. R., A. Fritz, E. M. De Robertis and J. B. Gurdon. 1987. A homeobox-containing marker of posterior neural differentiation shows importance of predetermination in neural induction. Cell 50: 749-758.

Shi, D.-L., T. D'Arribere, K. E. Johnson and J.-C.Boucaut. 1989. Initiation of mesodermal cell migration and spreading relative to gastrulation in the urodele amphibian Pleurodeles walti. Development 105: 351-363.

Shook, D. R., C. Majer and R. Keller. 2002. Urodeles remove mesoderm from the superficial layer by subduction through a bilateral primitive streak. Dev. Biol. 248: 220-239.

Sive, H. L. and P. F. Cheng. 1991. Retinoic acid perturbs the expression of Xhox-lab genes and alters mesodermal determination in Xenopus laevis. Genes Dev. 5: 1321-1332.

Smith, J. C. 2001. Making mesoderm: Upstream and downstream of Xbra. Int. J. Dev. Biol. 45: 219-224.

Smith, J. C. and G. M. Malacinski.1983. The origin of the mesoderm in an anuran, Xenopus laevis, and a urodele, Ambystoma mexicanum. Dev. BioL 98: 250-254.

Smith, J. C. and . M. W. Slack. 1983. Dorsalization and neural induction: Properties of the organizer in Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morphol. 78: 299-317.

Smith, W. C. and R. M. Harland. 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell 70: 829-840.

Smith, W. C., A. K. Knecht, M. Wu and R. M. Harland. 1993. Secreted noggin mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm. Nature 361: 547-5410.

Smith, W. C., R. McKendry, S. Ribisi and R. M. Harland. 1995. A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. Cell 82: 37-46.

Spemann, H. 1903. Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei. III. Arch. Entv.icklungsmech. 16: 551-631.

Spemann, H. 1918. ber die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 43: 448-555.

Spemann, H. 1927. Neue Arbieten uber Organisatoren in der tierischen Entwicklung. Naturwissenschaften 15: 946-951.

Spemann, H. 1938. Embryonic Development and Induction. Yale University Press, New Haven.

Spemann, H. and H. Mangold. 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. (Trans. V. Hamburger). In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 144-184. Reprinted in Int. 1. Deu Biol. 45: 13-38.

Spofford, W. R. 1945. Observations on the posterior part of the neural plate in Ambystoma. J. Exp. Zool. 99: 35-52.

Stancheva, I., O. El-Maarri, J. Walter, A. Niveleau and R. R. Meehan. 2002. DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in Xenopus laevis embryos. Dev. Biol. 243(1): 155-165.

Strauss, E.1998. How embryos shape up. Science 281: 166-167.

Suzuki, A., R. S. Thies, N. Yamaji, J. J. Song, J. M. Wozney, K. Muramaki and N. Ueno. 1994. A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in eatly Xenopus embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10255-10259.

Suzuki, A., N. Ueno and A. Hemmati-Brivanlou. 1997b Xenopus msxl mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4. Development 124: 3037-3044.

Toivonen, S. 1938. Spezifische Induktionsleistungen von abnormen Induktoren im Implantatversuch. Ann. Soc. Zool.-Bot. Fenn. Vanano 6 (5):1-12.

Toivonen, S. 1979. Transmission problem in primary induction. Differentiation 15: 177-181.

Toivonen, S. and L. Saxén. 1955. The simultaneous inducing action of liver and bone marrow of the guinea pig in implantation and explantation experiments with embryos of Triturus. Exp. Cell Res. [Suppl.] 3: 346-357.

Toivonen, S. and L. Saxen 1968. Morphogenetic interaction of presumptive neural and mesodermal cells mixed in different ratios. Science 159: 539-540.

Toivonen, S. and J. Wartiovaara. 1976. Mechanism of cell interaction during primary induction studied in transfilter experiments. Differentiation 5: 61-66.

Toivonen, S., D. Tarin, L. Saxén, P. J. Tarin and J. Wartiovaara. 1975. Transfiker studies on neura. induction in the newt. Differentiation 4: 1-7.

Twitty, V. C. 1966. f Scientists and Salamanders. Freeman, San Francisco.

Valles, J. M., Jr., S. R. Wasserman, C. Schweidenback, J. Edwardson, J. M. Denegre and K. L. Mowry. 2002. Processes that occur before second cleavage determine third cleavage orientation in Xenopus. Exp. Cell Res. 274: 112-118.

Vincent, J. P. and J. C. Gerhart. 1987. Subcortical rotation in Xenopus eggs: An early step in embryonic axis specification. Dev. Biol. 123: 526-539.

Vincent, J. P., G. P. Oster and J. C. Gerhart. 1986. Kinematics of gray crescent formation in Xenopus eggs: Displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Dev. Biol. 113: 484-500.

Wallingford, J. B., A. J. Ewald, R. M. Harland and S. F. Fraser. 2001. Calcium signaling during convergent extension in Xenopus. Curr. Biol. 11: 652-661.

Wang, S., M. Krinks, K. Lin, F. P. Luyten and M. Moos, Jr. 1997. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. Cell 88: 757-766.

Wessley, Q, E. Agius, M. Oelgeschlager, E. M. Pera and E. M. De Robertis.2001. Neural induction in the absence of mesoderm: β-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in Xenopus. Dev. Biol. 234: 161-173.

White, R. I., B. I. Sun, H. L. Sive and J. C. Smith. 2002. Direct and indirect regulation of dertiere, a Xenopus mesoderm-inducing factor, by VegT. Development 129: 4867-4876.

Wilson, P. A. and A. Hemmati-Brivanlou. 1995. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP-4. Nature 376: 331-333.

Wilson, P. and R. Keller. 1991. Cell rearrangement during gastrulation of Xenopus: Direct observation of cultured explants. Development 112: 289-300.

Winklbauer, R. and R. E. Keller. 1996. Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in Xenopus. Dev Biol. 177: 413-42

Winklbauer, R. and M. Nagel. 1991. Directional mesoderm cell migration in the Xenopus gastrula. Dev. Biol. 148: 573-589.

Winklbauer, R. and M. Schirfeld. 1999. Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in Xenopus. Development 126: 3703-3713.

Wylie, C., M. Kofron, C. Payne, R. Anderson, M. Hosobuchi, E. Joseph and J. Heasman. 1996. Maternal -catenin establishes a "dorsal signal" in early Xenopus embryos. Development 122: 2987-2996.

Yamamoto, T. S., C. Takagi and N. Ueno. 2000. Requirement of Xmsx-l in the BMP-triggered ventralization of Xenopus embryos. Mech. Dev. 91: 131-141.

Yang, J., C. Tan, R. S. Darken, P. A. Wilson and P. S. Klein. 2002. -Catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. Development 129: 5743-5752.

Yost, C., M. Torres, J. R. Miller, E. Huang, D. Kimelman and R. T. Moon. 1996. The axis-inducing ability, stability, and subcellular localization of β-catenin are regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase-3. Genes Dev. 10: 1443-1454.

Yost, H. J. 1998. Left-right development in Xenopus and zebrafish. Semin. Cell Dev. Biol. 9: 61-66.

Zhang, J., D. W. Houston, M. L. King, C. Payne, C. lie and J. Heasman. 1998. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos. Cell 94: 515-524.

Zimmerman, L. B., J. M. de Jesús Escobar and R. M. Harland. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenesis protein 4. Cell 86: 599-606.

Capítulo 11 Desarrollo temprano en los vertebrados: peces, aves y mamíferos

Mi estimado amigo... la vida es infinitamente más extraña que lo que la mente de un hombre podría inventar. No nos atreveríamos a concebir las cosas que son realmente meros lugares comunes de la existencia.

A. CONAN DOYLE (1891)

Entre el quinto y el décimo día el grupo de células madres se diferencia en el plan general de construcción del embrión (ratón) y de sus órganos. Se parece un poco a un trozo de hierro que se convierte en la lanzadera espacial. De hecho, es la maravilla más profunda que todavía podemos imaginar y aceptar, y al mismo tiempo tan usual que tenemos que esforzarnos para maravillarnos acerca de la prodigiosidad de esta maravilla.

MIROSLAV HOLUB (1990)

ESTE CAPITULO FINAL SOBRE LOS PROCESOS del desarrollo temprano extenderá los estudios sobre el desarrollo de los vertebrados en peces, aves y mamíferos. Los embriones de anfibio descritos en el capítulo anterior se dividen por medio de segmentación holoblástica radial. La segmentación en el huevo (cigoto)* del ave, del reptil y del pez es meroblástica; tan solo una pequeña porción del citoplasma del cigoto es utilizada para producir células. Los mamíferos modifican su segmentación holoblástica para producir una placenta, que le permite al embrión desarrollarse dentro de otro organismo. Aunque los métodos de gastrulación también difieren entre las clases de vertebrados, hay algunos principios subyacentes comunes a todos los vertebrados.

DESARROLLO TEMPRANO EN LOS PECES

En los últimos años, el pez teleósteo *Danio rerio*, comúnmente conocido como pez cebra (*zebrafish*), se ha convertido en el organismo modelo preferido de los que estudian el desarrollo de los vertebrados. Los peces cebra tiene grandes camadas, se reproducen durante todo el año, son fácilmente mantenidos, tienen embriones transparentes que se desarrollan fuera de la madre (una característica importante para la microscopia), y pueden criarse de modo tal que los mutantes pueden ser fácilmente investigados y propagados. Además, se desarrollan rápidamente, de manera que 24 horas después de la fecundación, el embrión tiene formados la mayor parte de sus tejidos y primordios de órganos y muestra la característica forma parecida al renacuajo (fig. 11-1; véase Granato y Nüsslein-Volhard 1996; Langeland y Kimmel 1997). Por lo tanto, la mayor parte de la descripción del desarrollo del pez que se verá a continuación está basada en estudios de esta especie.

El pez cebra es además el primer vertebrado para el que se ha intentado una mutagénesis intensiva. Mediante el tratamiento de los progenitores con mutágenos y la reproducción selectiva de sus progenies, los científicos han hallados cientos de mutaciones cuyos genes, que funcionan normalmente, son críticos para el desarrollo del pez cebra. El método tradicional de estudio genético (modelado después de estudios en gran escala en *Drosophila*) comienza cuando el pez progenitor macho es tratado con un mutágeno químico que causará mutaciones al azar en sus células germinales (fig. 11-2). Cada macho mutagenizado es luego apareado con un pez hembra tipo salvaje para generar las líneas F_1. Los individuos de la generación F_1 llevan las mutaciones he-

* *Nota del traductor:* el proceso de segmentación como período comienza a partir del momento en el cual el cigoto inicia la primera segmentación del desarrollo embrionario. Cuando se hace referencia al "tipo" de segmentación adoptado por el huevo, se está considerando el mecanismo de segmentación que caracterizará a ese cigoto. Se puede utilizar la denominación de huevo, pero se debe recordar que es un estadio de cigoto.

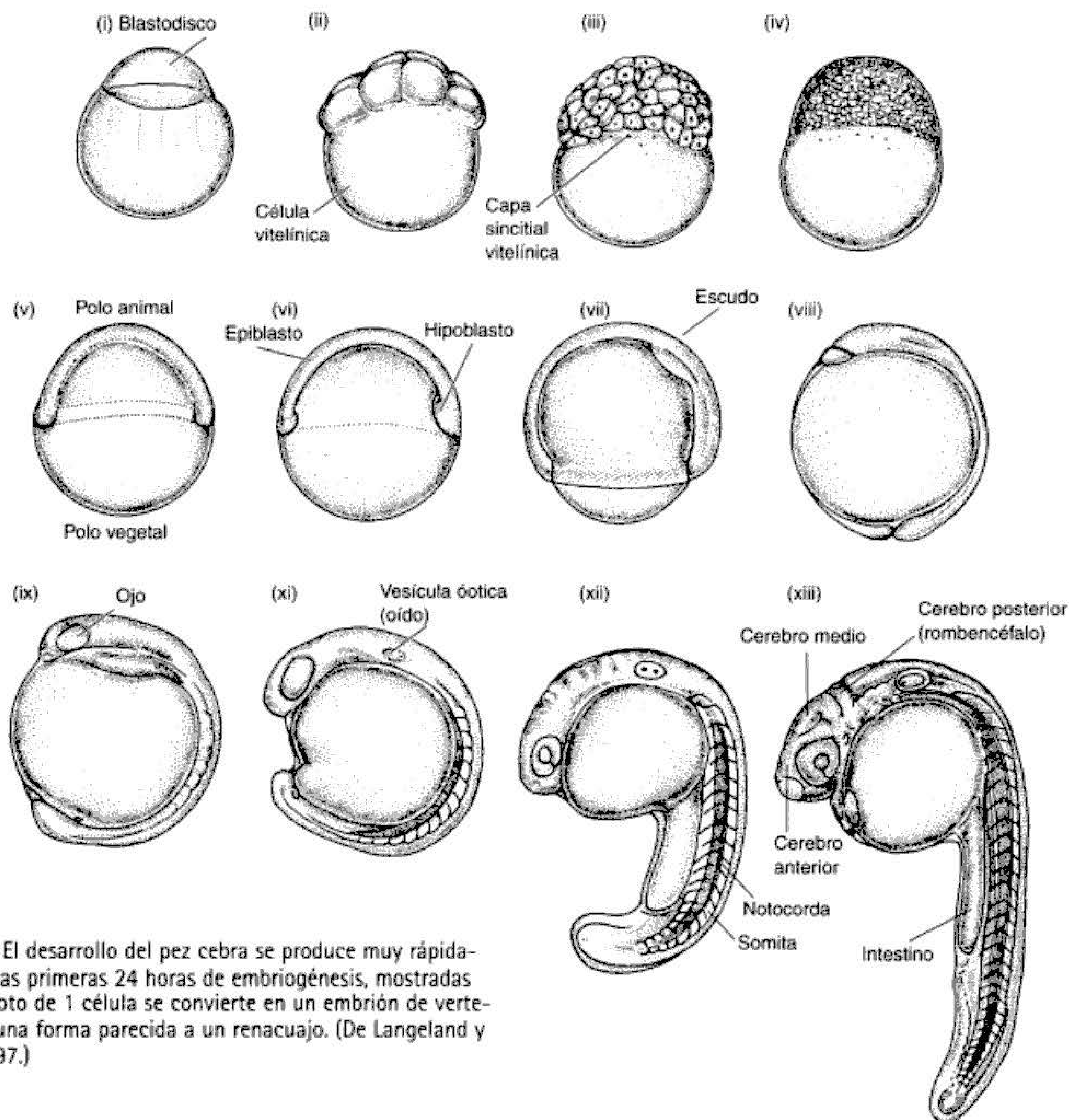


Fig. 11-1. El desarrollo del pez cebra se produce muy rápidamente. En las primeras 24 horas de embriogénesis, mostradas aquí, el cigoto de 1 célula se convierte en un embrión de vertebrado con una forma parecida a un renacuajo. (De Langeland y Kimmel 1997.)

redadas de su padre. Si la mutación es dominante, llegará a expresarse en la generación F_1. Si estas mutaciones son recesivas, el pez F_1 no mostrará un fenotipo mutante, debido a que el alelo tipo salvaje ocultará la mutación. El pez F_1 es luego apareado con un pez tipo salvaje para producir la generación F_2. Esta generación F_2 incluirá a machos y hembras que tienen el alelo mutante. Cuando dos progenitores F_2 contienen la misma mutación recesiva, hay un 25% de posibilidad de que sus crías muestren el fenotipo mutante (fig. 11-2). Debido a que el desarrollo del pez cebra se produce al descubierto (no en una cubierta opaca o dentro de la madre), los estadios de desarrollo anormal pueden observarse fácilmente y los defectos en el desarrollo a menudo pueden remontarse a cambios en un grupo particular de células (Driever y col. 1996; Haffter y col. 1996).

Las semejanzas de los programas de desarrollo entre todos los vertebrados le han dado al pez cebra un papel importante en la investigación de los genes que funcionan durante el desarrollo humano. Los métodos de análisis genéticos descritos antes han permitido identificar a miles de genes que pueden además ser activos en el desarrollo humano. Por ejemplo, el gen *mariner* del pez cebra codifica la proteína miosina VIIA hallada en la vesícula ótica. Las mutaciones de este gen en el pez cebra afectan la audición al evitar que se formen apropiadamente las células sensoriales de la vesícula ótica. Los humanos con la alteración del gen que codifica la miosina VIIA tienen un síndrome de sordera congénita (Ernest y col. 2000).

Los genes del pez cebra son extremadamente dóciles de estudiar. Los embriones del pez cebra son susceptibles a las moléculas antisentido de morfolino (Zhong y col. 2001; véase cap. 4), y los investigadores pueden utilizar este método para analizar si un gen particular es requerido para una función determinada. Además, el gen reportero de la proteína fluorescente verde (GFP) puede fusionarse con promotores y potenciadores específicos del pez cebra e insertarse en los embriones del pez. El pez transgénico resultante expresará GFP en los mismos tiempos y lugares como lo harán las mismas proteínas controladas por estas secuencias reguladoras. Lo asombroso es que se puede observar la proteína reportera en los embriones vivos (fig. 11-3).

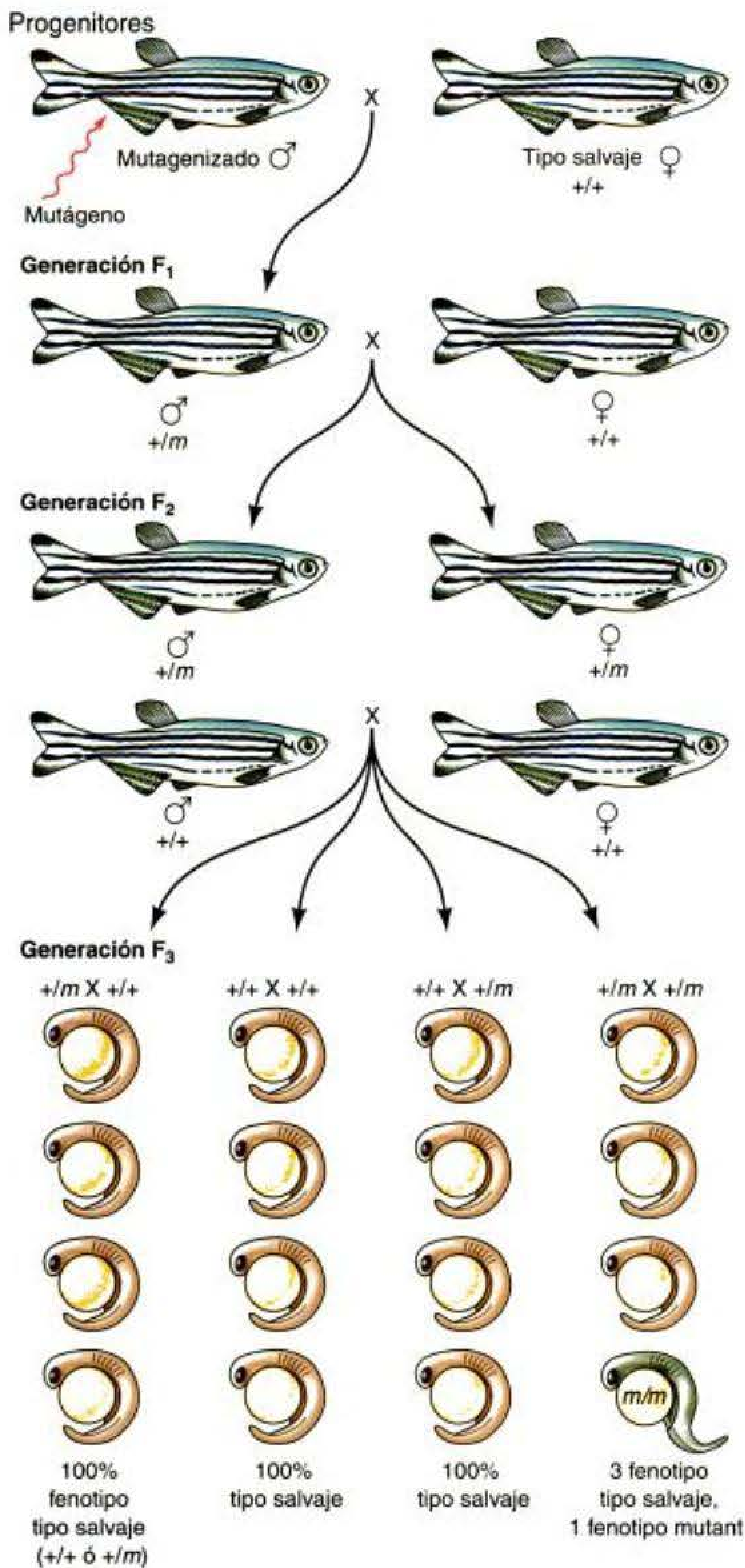


Fig. 11-2. Protocolo de estudio para la identificación de mutaciones del desarrollo del pez cebra. El progenitor macho es mutagenizado y apareado con una hembra tipo salvaje (+/+). Si alguno de los espermatozoides del macho es portador de un alelo mutante recesivo (*m*), entonces alguno de la progenie F_1 del apareamiento heredará este alelo. Los individuos F_1 (aquí mostrados como un macho portador del alelo mutante *m*) son entonces apareados con parejas tipo salvajes. Esto crea una generación F_2 en la cual algunos machos y algunas hembras son portadores del alelo mutante recesivo. Cuando los peces F_2 son apareados, algunas de sus progenies mostrarán el fenotipo mutante. (Según Haffter y col. 1996.)

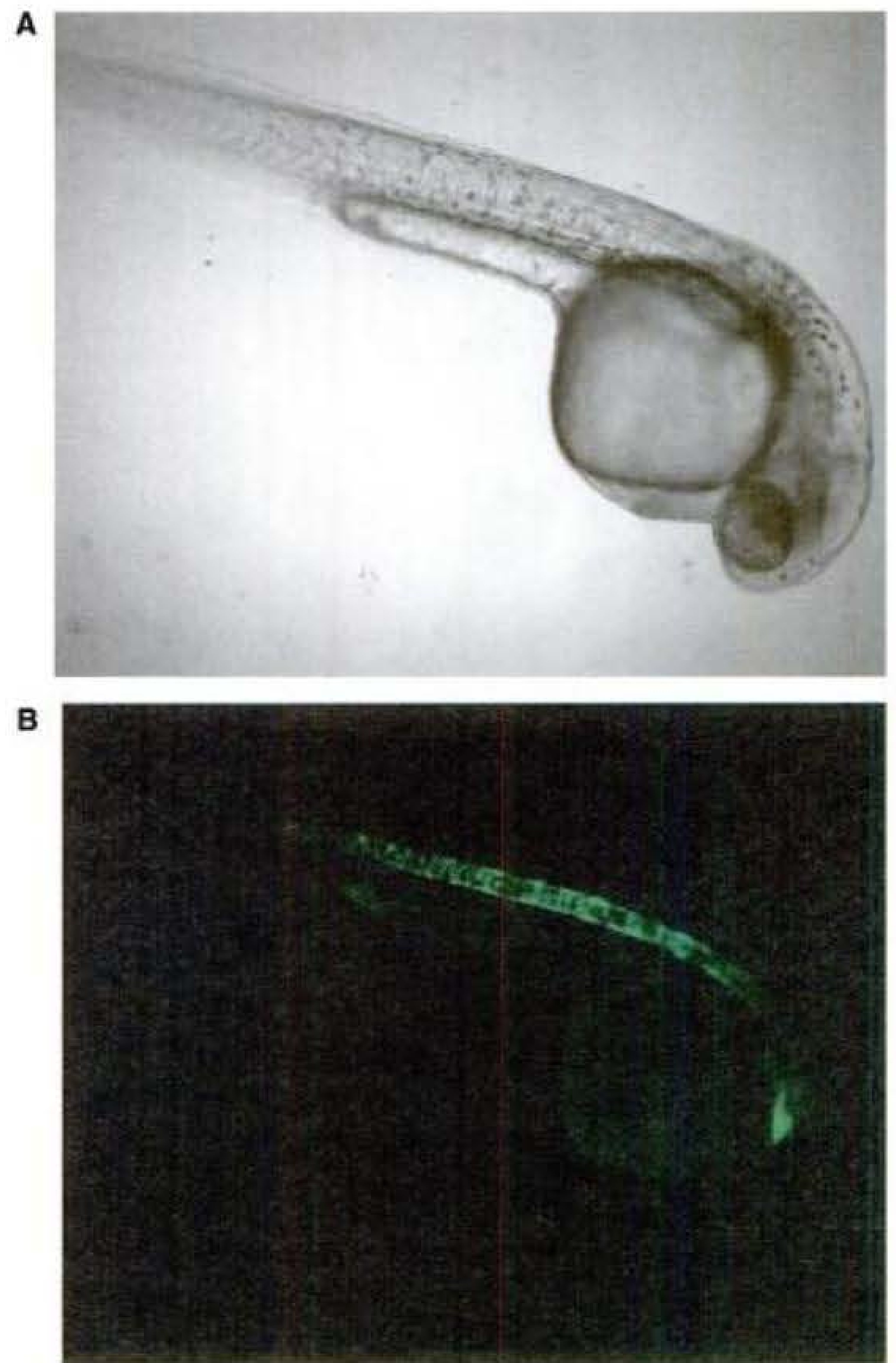


Fig. 11-3. GFP regulada en embriones de pez cebra vivos. El gen para la proteína fluorescente verde (GFP) fue fusionado a la región regulatoria de un gen *hedgehog* del pez cebra. Como resultado, la GFP fue sintetizada en todos los sitios en los que la proteína Hedgehog es normalmente expresada en el embrión del pez. Aquí esta expresión se observa en la notocorda de un embrión de pez cebra vivo de 24 horas. **A.** Fotografía de campo claro del embrión. **B.** Fotografía del mismo embrión en luz fluorescente. (De Du y Dienhart 2001; fotografías cortesía de S. J. Du.)

Y como un atributo más, los embriones de pez cebra son permeables a pequeñas moléculas colocadas en el agua. Esta propiedad permite llevar a cabo pruebas de medicamentos que podrían ser perjudiciales para el desarrollo de vertebrados. Por ejemplo, el desarrollo del pez cebra puede alterarse mediante el agregado de etanol o ácido retinoico de un modo que se asemeja a los síndromes de desarrollo humano causados por estas moléculas (Blader y Strähle 1998).

Con estas ventajas de investigación sobre este organismo, muchos biólogos del desarrollo creen que el pez cebra permitirá adquirir un perfil detallado del desarrollo de los vertebrados.

SITIO WEB 11.1 **Películas y fotografías del pez cebra con GFP (GFP zebrafish movies and photographs).** La capacidad para fotografiar y filmar embriones vivos que expresan el gen reportero GFP en sitios específicos del promotor ha abierto una nueva dimensión en la biología del desarrollo y ha

permitido relacionar la estructura del gen con la anatomía del desarrollo.

VADE MECUM[2] **Desarrollo del pez cebra (Zebrafish development).** Un relato completo del desarrollo del pez cebra incluye películas del hermoso y rápido desarrollo de este organismo.
[Hacer clic sobre Zebrafish]

Segmentación en los cigotos del pez cebra

Los cigotos del pez cebra son **telolecíticos**, lo cual significa que la mayor parte del cigoto está ocupada por vitelo. La segmentación puede tener lugar solamente en el **blastodisco**, una delgada región de citoplasma libre de vitelo en el polo animal del cigoto. Las divisiones celulares no dividen por completo al cigoto, de modo tal que este tipo de segmentación es denominada **meroblástica** (griego *meros*, "parte"). Debido a que solo el blastodisco llega a ser el embrión, este tipo de segmentación meroblástica es denominada **discoidal**.

Las microfotografías electrónicas de barrido muestran magníficamente la naturaleza incompleta de la segmentación meroblástica discoidal de la segmentación en los cigotos de los peces (fig. 11-4). Las ondas de calcio iniciadas en la fecundación estimulan la contracción del citoesqueleto de actina para restringir el citoplasma no vitelínico al polo animal del cigoto. Este proceso convierte al cigoto esférico en una estructura con forma de pera con un blastodisco apical (Leung y col. 1998, 2000). Las primeras divisiones celulares siguen un patrón sumamente reproducible de segmentaciones meridionales y ecuatoriales. Estas divisiones son rápidas, toman cada una de ellas cerca de 15 minutos. Las primeras 12 divisiones se producen de manera sincrónica y forman un montículo de células que se asienta sobre el polo animal de una **célula vitelínica** grande. Estas células constituyen el **blastodermo**. Inicialmente, todas las células mantienen alguna conexión abierta entre sí y con la célula vitelínica subyacente, de modo tal que moléculas de tamaño moderado (17-kDa) pueden pasar libremente desde una blastómera a la siguiente (Kimmel y Law 1985).

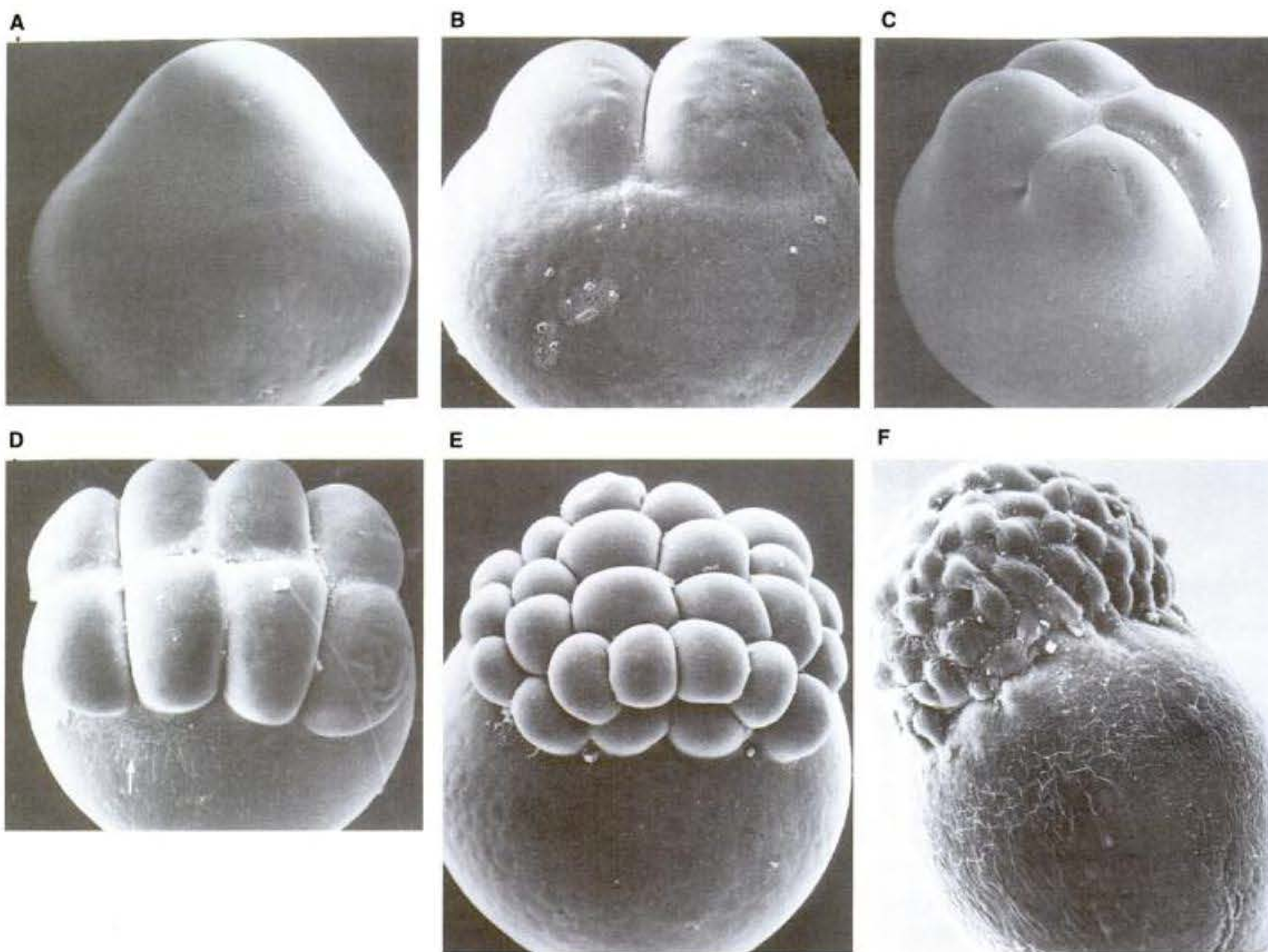


Fig. 11-4. Segmentación meroblástica discoidal en un huevo (cigoto) del pez cebra. **A.** Embrión de 1 célula. El montículo encima del citoplasma es el blastodisco. **B.** Embrión de 2 células. **C.** Embrión de 4 células. **D.** Embrión de 8 células en el cual se forman dos hileras de cuatro células cada una. **E.** Embrión de 32 células. **F.** Embrión de 64 células, en el cual puede verse el blastodisco encima de la célula vitelínica. (De Beams y Kessel 1976; microfotografías cortesía de los autores.)

Cerca del comienzo de la décima división celular, puede detectarse el inicio a la transición de la blástula media: comienza la transcripción génica cigótica, las divisiones celulares se enlentecen y se hacen evidentes los movimientos celulares (Kane y Kimmel 1993). En este momento, se pueden distinguir tres poblaciones celulares diferentes. La primera de éstas es la **capa sincitial vitelínica (CSV)**. La CSV se forma en el noveno o décimo ciclo celular, cuando las células en el borde vegetal del blastodermo se fusionan con la célula vitelínica subyacente. Esta fusión produce un anillo de núcleos dentro de la parte citoplasmática de la célula vitelínica que se sitúa justo por debajo del blastodermo. Posteriormente, a medida que el blastodermo se expande vegetalmente para rodear a la célula vitelínica, algunos de los núcleos sincitiales del vitelo se mueven bajo el blastodermo para formar la **CSV interna** y algunos de ellos se moverán vegetalmente, manteniéndose por delante del margen del blastodermo, para formar la **CSV externa** (fig. 11-5A,B). La CSV será importante para dirigir algunos de los movimientos celulares de la gastrulación. La segunda población celular distinguida en la transición a blástula media es la **capa de la envoltura** (fig. 11-5A). Ésta está formada por las células más superficiales a partir del blastodermo, que forman una lámina epitelial de una sola capa celular de espesor. La capa de la envoltura se convertirá finalmente en el **peridermo**, una cubierta protectora extraembrionaria que es liberada durante el desarrollo tardío. Entre la capa de la envoltura y la capa sincitial vitelínica están las **células profundas**. Éstas son las células que dan origen al embrión propiamente dicho.

Los destinos de las células del blastodermo temprano no están determinados y los estudios de linaje celular (en los que un colorante fluorescente no difusible es inyectado en una célula de modo tal que pueden ser seguidos los descendientes) muestran que hay una mayor mezcla durante la segmentación. Además, cualquiera de estas blastómeras tempranas puede dar origen a una variedad imprevisible de descendientes de tejidos (Kimmel y Warga 1987; Helde y col. 1994). El destino de las células del blastodermo parece ser fijado poco antes del comienzo de la gastrulación. En este momento, células en regiones específicas del embrión dan origen a ciertos tejidos de un modo sumamente predecible, y permiten que sea producido un mapa de destino (fig. 11-5C; véase además fig. 1-6; Kimmel y col. 1990).

Gastrulación en los embriones de los peces

El primer movimiento celular de la gastrulación del pez es la epibolia de las células del blastodermo sobre el vitelo. En la fase inicial de este movimiento, las células

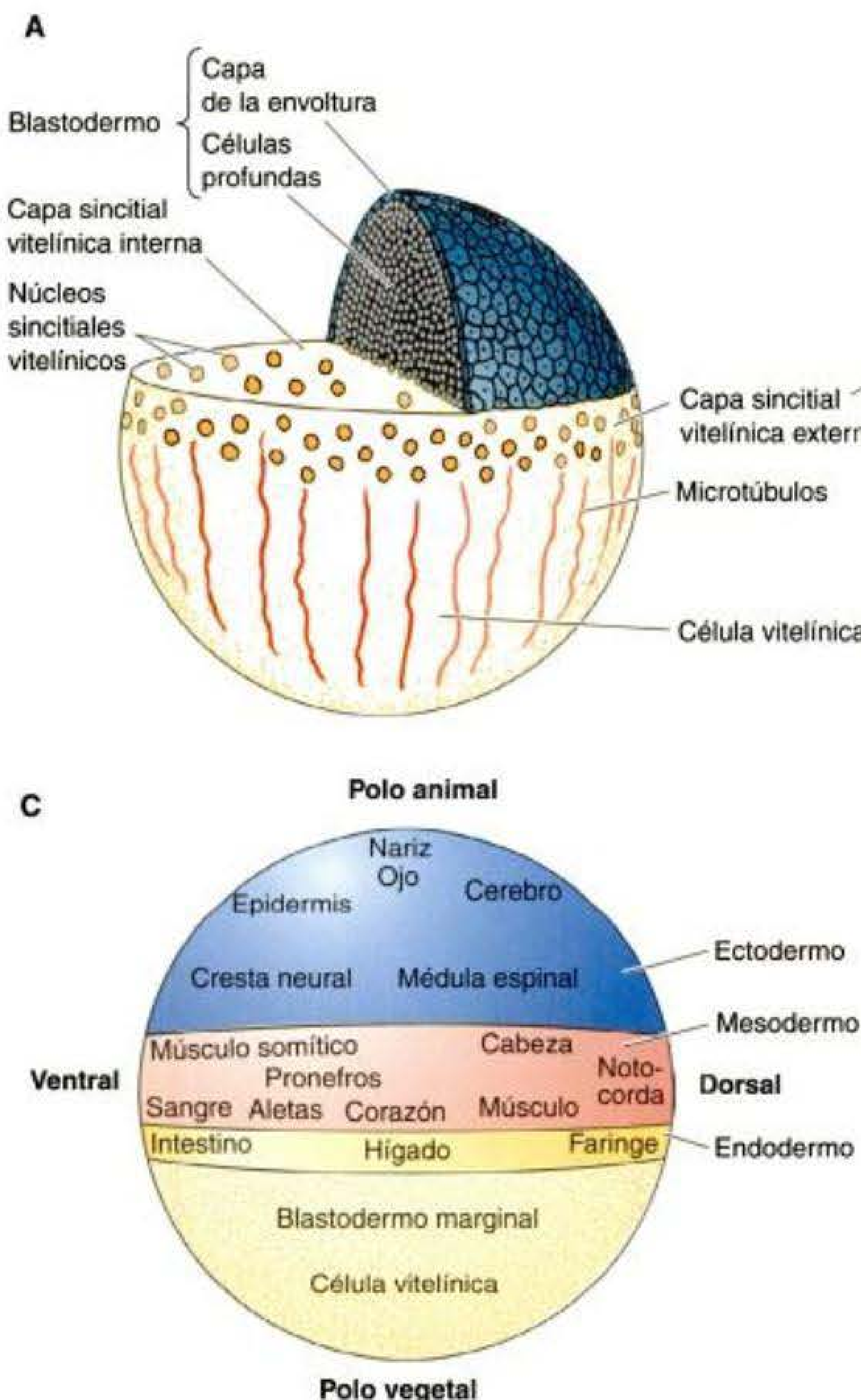




Fig. 11-5. Blástula de pez. **A.** Antes de la gastrulación, las células profundas están rodeadas por la capa de la envoltura. La superficie animal de la célula vitelínica es plana y contiene los núcleos de la capa sincitial vitelínica (CSV). Los microtúbulos se extienden a través del citoplasma vitelínico y a través de la región externa de la CSV. **B.** Embrión en estadio de blástula tardía del pez pequeño de agua dulce (*minnow*) *Fundulus*, que muestra la CSV externa. Los núcleos de estas células fueron derivados de las células del margen del blastodermo, que liberaron sus núcleos hacia el citoplasma vitelínico. **C.** Mapa de destino de las células profundas después de que la mezcla de células se ha detenido. Se muestra la vista lateral, y no todos los destinos de órganos están marcados (para una mejor claridad). (A y C, según Langeland y Kimmel 1997; B, de Trinkaus 1993, microfotografía cortesía de J. P. Trinkaus.)

profundas del blastodermo se mueven hacia afuera para intercalarse con las células más superficiales (Warga y Kimmel 1990). Posteriormente, esta concatenación de células se mueve vegetalmente sobre la superficie del vitelo y lo envuelve completamente (fig. 11-6). Sin embargo, este movimiento no es debido al arrastre activo de estas blastómeras. En su lugar, el movimiento descendente hacia el polo vegetal es el resultado de la expansión autónoma de la CSV "dentro" del citoplasma de la célula vitelínica. La capa de la envoltura está estrechamente unida a la CSV y es arrastrada junto con ésta. Las células profundas del blastodermo luego llenan el espacio entre la CSV y la capa de la envoltura a medida que continúa la epibolia. Este mecanismo puede demostrarse mediante la ruptura de las uniones entre la CSV y la capa de la envoltura. Cuando esto es hecho, la capa de la envoltura y las células profundas se sueltan nuevamente hacia la parte superior del vitelo, mientras que la CSV continúa su expansión alrededor de la célula vitelínica (Trinkaus 1984, 1992). La expansión de la CSV depende de una red de microtúbulos dentro de ésta, y la radiación o los fármacos que bloquean la polimerización de la tubulina inhiben la epibolia (Strahle y Jesuthasan 1993; Solnica-Krezel y Driever 1994).

Durante la epibolia, un lado del blastodermo se vuelve sensiblemente más grueso que el otro. Los experimentos de marcación celular indican que el lado más grueso marca el sitio de la futura superficie dorsal del embrión (Schmitz y Campos-Ortega 1994).

La formación de las capas germinales

Luego que las células del blastodermo han cubierto cerca de la mitad de la célula vitelínica del pez cebra (y más temprano en huevos de pez con vitelos más grandes), se produce un engrosamiento a lo largo del margen del blas-

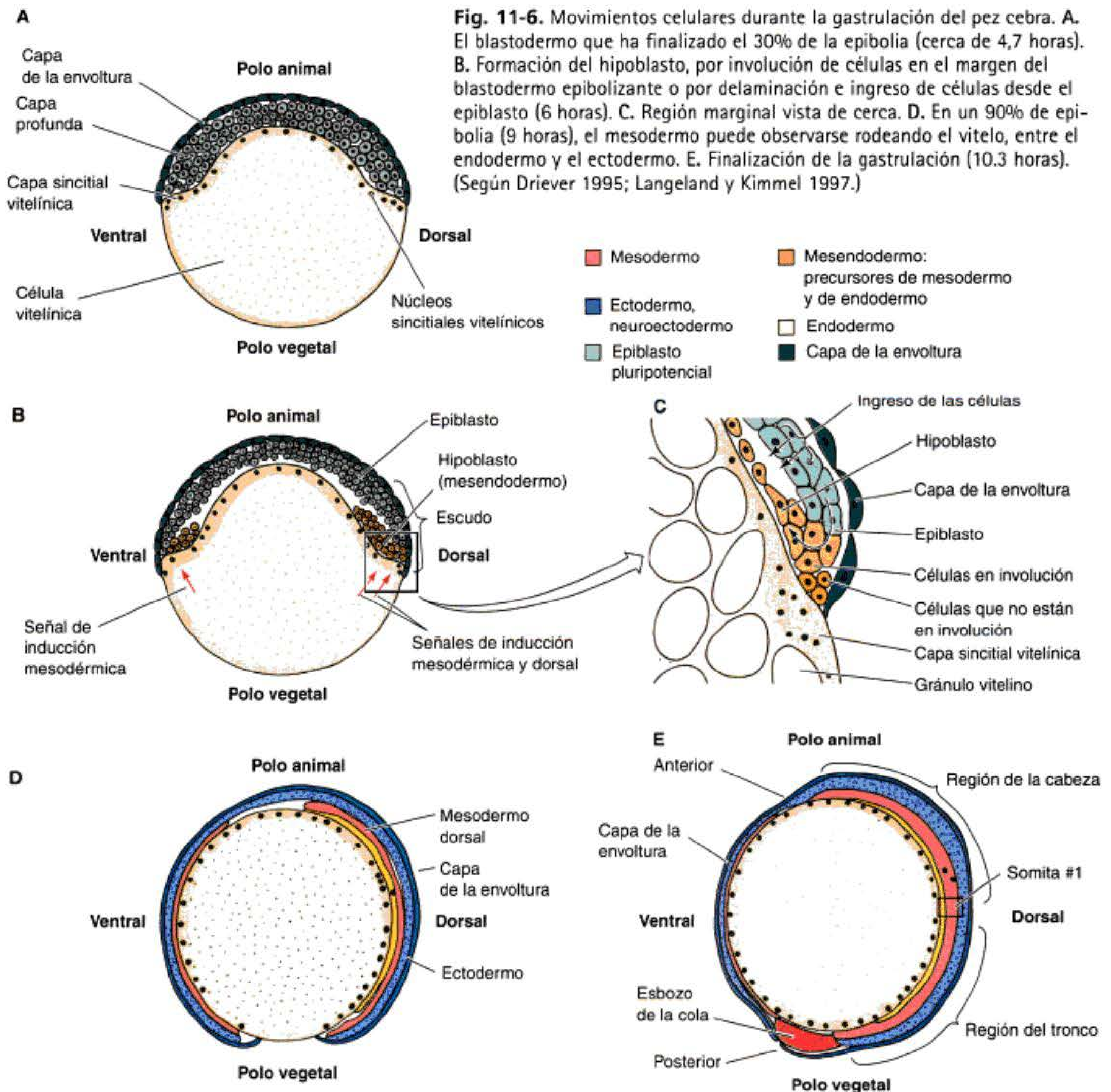


Fig. 11-6. Movimientos celulares durante la gastrulación del pez cebra. **A.** El blastodermo que ha finalizado el 30% de la epibolia (cerca de 4,7 horas). **B.** Formación del hipoblasto, por involución de células en el margen del blastodermo epibolizante o por delaminación e ingreso de células desde el epiblasto (6 horas). **C.** Región marginal vista de cerca. **D.** En un 90% de epibolia (9 horas), el mesodermo puede observarse rodeando el vitelo, entre el endodermo y el ectodermo. **E.** Finalización de la gastrulación (10.3 horas). (Según Driever 1995; Langeland y Kimmel 1997.)

todermo en epibolización. Este engrosamiento es denominado **anillo germinal**, y está compuesto de una capa superficial, el **epiblasto**, y de una capa interna, el **hipoblasto**. No se comprende cómo se produce el hipoblasto. Algunos grupos de investigadores afirman que el hipoblasto se forma por la involución de las células superficiales a partir del blastodermo bajo el margen seguida por su migración hacia el polo animal (véase fig. 11-6C); en este escenario, la involución comienza en la futura porción dorsal del embrión, pero todo se produce alrededor del margen. Otros laboratorios sostienen que la ingresión de las células superficiales forma el hipoblasto (véase Trinkaus 1996). Es posible que ambos mecanismos estén en funcionamiento, con diferentes modos de formación de hipoblasto predominando en distintas especies.

Una vez que se ha formado el hipoblasto, las células del epiblasto y del hipoblasto se intercalan sobre el futuro lado dorsal del embrión para formar un engrosamiento localizado, el **escudo embrionario** (fig. 11-7). Como se verá, este escudo embrionario es funcionalmente equivalente al labio dorsal del blastoporo de anfibios, debido a que puede organizar un eje embrionario secundario cuando es trasplantado al embrión huésped (Oppenheimer 1936; Ho 1992). Por lo tanto, a medida que las células del blastodermo experimentan epibolia alrededor del vitelo, también están involucionando en los márgenes y convergiendo anteriormente y dorsalmente hacia el escudo embrionario (Trinkaus 1992). Las células del hipoblasto del escudo embrionario mismo convergen y se extienden anteriormente, estrechándose finalmente a lo largo de la línea media dorsal del hipoblasto. Este movimiento forma el **cordamesodermo**, el precursor de la **notocorda** (fig. 11-7B). Las células adyacentes al cordamesodermo, las células del **mesodermo paraxial**, son las precursoras de los somitas mesodérmicos (fig. 11-7C). La convergencia y la extensión simultáneas en el epiblasto traen a las células neurales presuntivas desde todas partes del epiblasto hacia la línea media dorsal, donde ellas forman la **quilla neural**. Aquellas células remanentes en el epiblasto se convierten en el ectodermo. El mapa de destino del pez cebra, entonces, no es muy diferente de aquel de la rana o de otros vertebrados (como muy pronto se verá). Si se abre conceptualmente una blástula de *Xenopus* en el polo vegetal y se estira la apertura hacia el anillo marginal, el mapa de destino resultante se asemeja estrechamente al del embrión del pez cebra en el estadio cuando la mitad del vitelo ha sido cubierta por el blastodermo (véase fig. 1-9; Langeland y Kimmel 1997).

Mientras tanto, el endodermo se origina desde las blastómeras más marginales de la blástula tardía del embrión. Estas blastómeras involucionan más temprano en la gastrulación y ocupan las capas profundas del hipoblasto, directamente por arriba de la CSV.

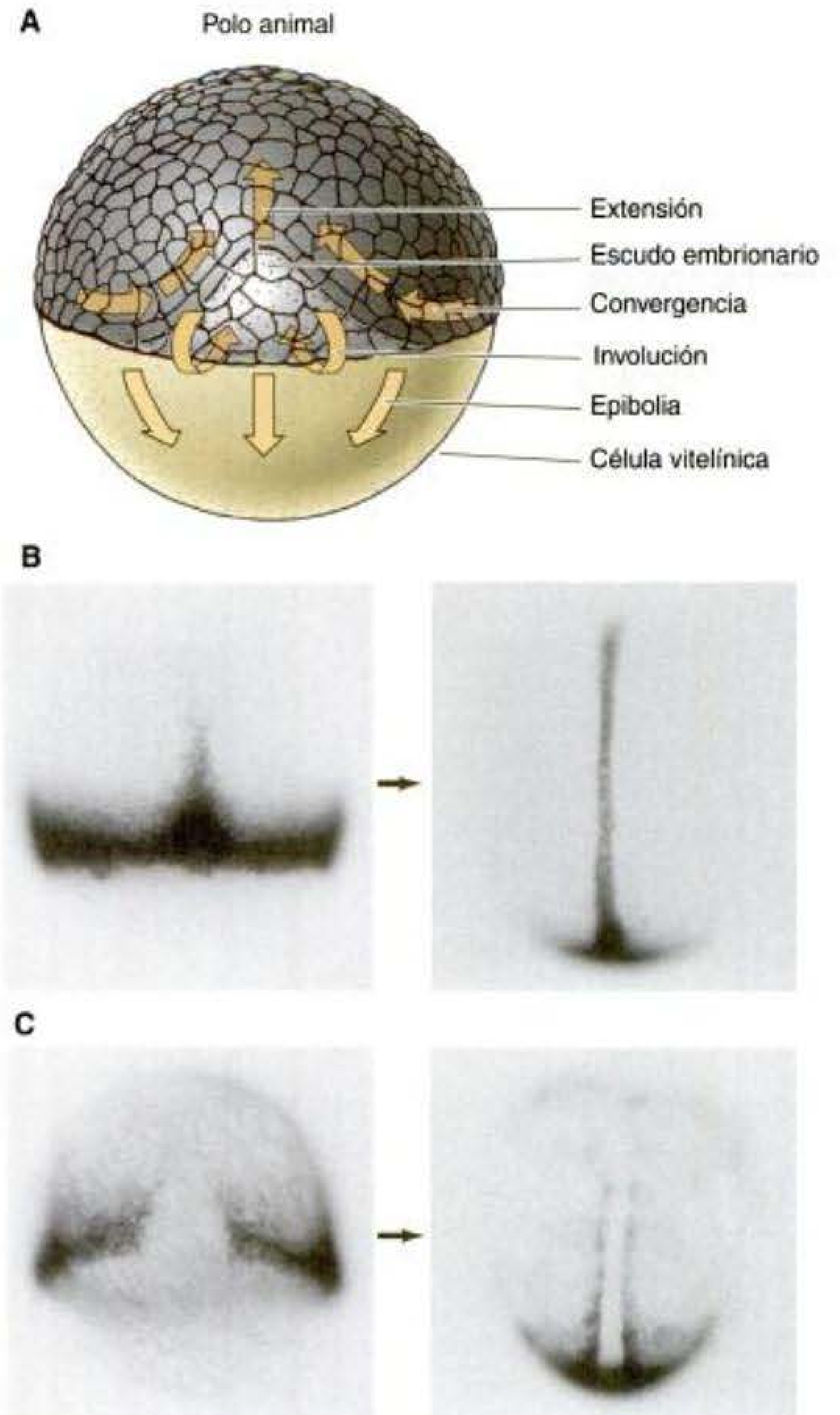


Fig. 11-7. Convergencia y extensión en la gástrula del pez cebra. **A.** Vista dorsal de los movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación del pez cebra. La epibolia extiende al blastodermo sobre el vitelo; la involución o el ingreso generan el hipoblasto; la convergencia y la extensión traen a las células del hipoblasto y del epiblasto hacia el lado dorsal para formar el escudo embrionario. Dentro del escudo, la intercalación extiende el cordamesodermo hacia el polo animal. **B.** Se muestra la extensión convergente del cordamesodermo por las células que expresan el gen *no tail*, un gen que es expresado por las células de la notocorda. **C.** Extensión convergente de las células del mesodermo paraxial situándose a ambos lados de la notocorda. Estas células están marcadas por la expresión del gen *snail* (áreas oscuras). (De Langeland y Kimmel 1997; microfotografías cortesía de los autores.)

Formación del eje en los embriones de los peces

Formación del eje dorsoventral: el escudo embrionario

El escudo embrionario es crítico en el establecimiento del eje dorsoventral en el pez. Este puede convertir al mesodermo lateral y ventral (precursores de los tejidos sanguíneo y conectivo) en mesodermo dorsal (notocorda y somitas), y puede hacer que el ectodermo se convierta en neural en lugar de epidérmico. Esto fue demostrado por experimentos de trasplante en los cuales el escudo embrionario de un embrión en gástrula temprana fue trasplantado hacia el lado ventral de otro (fig. 11-8; Oppenheimer 1936; Koshida y col. 1998). Se formaron dos ejes, que comparten una célula de vitelo en común. Aunque la placa precordal y la notocorda eran derivados desde el escudo embrionario donante, los otros órganos del eje secundario provenían desde tejidos del huésped que deberían haber formado estructuras ventrales. Este nuevo

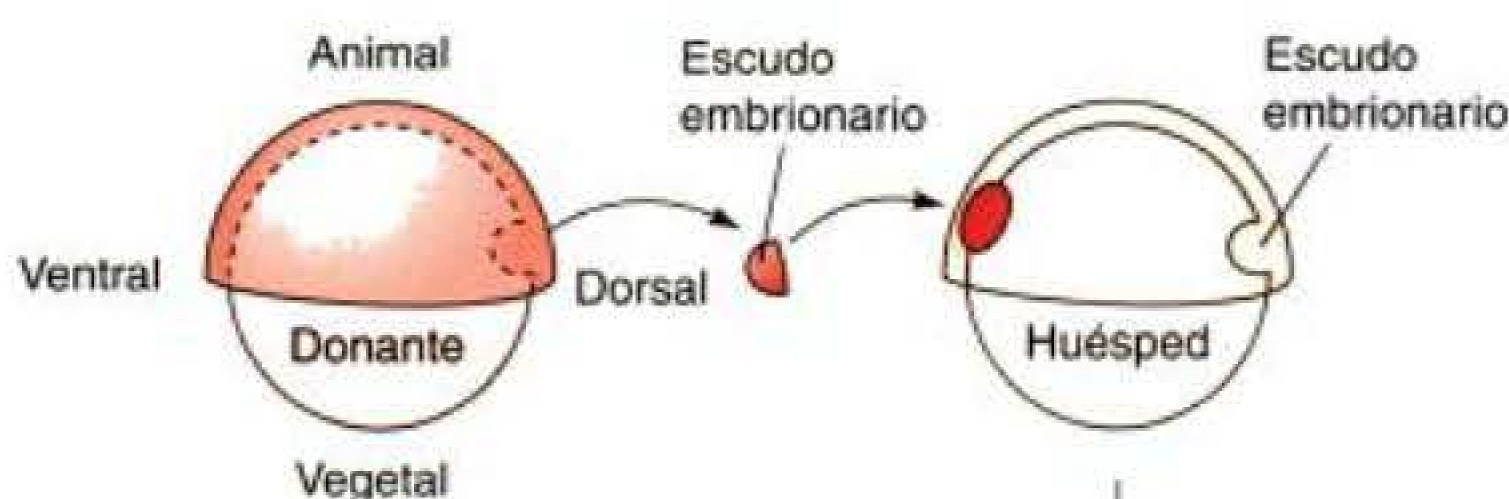




Fig. 11-8. El escudo embrionario como organizador en el embrión del pez. Un escudo embrionario donante (cerca de 100 células de un embrión teñido) es trasplantado hacia un embrión huésped en el mismo estadio de gástrula temprana. El resultado es dos ejes embrionarios unidos a la célula vitelínica del huésped. En la microfotografía, ambos ejes han sido teñidos para el mRNA de *sonic hedgehog*, que es expresado en la línea media ventral. (El embrión de la derecha es el eje secundario.) (Según Shinya y col. 1999; microfotografía cortesía de los autores.)

eje ha sido inducido por las células donantes. En el embrión en el que se había extirpado su escudo embrionario, no se formaron estructuras dorsales y el embrión carecía de sistema nervioso. Estos experimentos eran similares a los realizados sobre las gástrulas de anfibio por Spemann y Mangold (1924; véase cap. 10), y ellos demostraron que el escudo embrionario es el homólogo del labio dorsal del blastoporo, el organizador del anfibio.

Como el labio dorsal del blastoporo de anfibio, el escudo embrionario forma la placa precordal y la notocorda del embrión en desarrollo. Los precursores de estas dos regiones son responsables de inducir el ectodermo para convertirse en ectodermo neural. Además, la notocorda presuntiva y la placa precordal parecen hacer esto de un modo casi semejante al de las estructuras homólogas en anfibios.* En peces y en anfibios, las proteínas BMP y ciertas Wnt producidas en las regiones ventral y lateral del embrión inducirán normalmente al ectodermo a convertirse en epidermis. La notocorda de peces y anfibios secreta factores que bloquean esta inducción y de este modo permite que el ectodermo llegue a ser neural. En el pez, **BMP2B** induce a las células embrionarias a adquirir destinos ventral y lateral y **Wnt8** ventraliza, lateraliza y posterioriza a los tejidos embrionarios (véase Schier 2001). La proteína secretada por el cordamesodermo que se une a BMP2B y lo inactiva es un factor paracrino parecido a la cordina denominado **Cordino** (fig. 11-9B; Kishimoto y col. 1997; Schulte-Merker y col. 1997). Si el gen *cordino* es mutado, el tubo neural no se forma. Se postuló la hipótesis (Nguyen y col. 1998) que diferentes concentraciones de BMP2B establecen el patrón de las regiones ventral y lateral del ectodermo y del mesodermo del pez cebra, y que la proporción de Cordino en relación a BMP2B puede especificar la posición a lo largo del eje dorsoventral. En el pez, la notocorda puede no ser la única estructura capaz de producir las proteínas que bloquean a BMP2B. Si la notocorda no se forma (como en las mutaciones *floating head* –cabeza flotante– o *no tail* –sin cola–), el tubo neural todavía será producido. Es posible que las células precursoras de la notocorda (que son producidas en estas mutaciones) son todavía capaces de inducir el tubo neural, o que la porción dorsal de los precursores del somita pueden compensar la carencia de una notocorda (Halpern y col. 1993; 1995; Hammerschmidt y col. 1996).

El centro de Nieuwkoop de los peces

El escudo embrionario parece adquirir esta capacidad organizadora casi del mismo modo que su equivalente del anfibio. En anfibios, las células del endodermo por debajo del labio dorsal del blastoporo (es decir, el centro de Nieuwkoop) acumulan β-catenina sintetizada a partir de los mensajeros maternos. Esta proteína es crítica en anfibios para la capacidad del endodermo para inducir a las células situadas por arriba de éste a convertirse en las células del labio dorsal (organizador). En el pez cebra, los núcleos en la parte de la capa sincitial vitelínica que se localizan debajo de las células que se convertirán en el escudo embrionario, de modo semejante acumulan β-catenina. Esta proteína distingue las regiones dorsal de la CSV de las regiones lateral y ventral de la CSV (fig. 11-10; Schneider y col. 1996). La inducción de acumulación de β-catenina sobre el lado ventral del huevo (cigoto) genera dorsalización y un segundo eje embrionario (Kelly y col. 1995).

La β-catenina del escudo embrionario se combina con el homólogo de Tcf3 del pez cebra para convertirse en un factor de transcripción activo. Éste activa a los genes que codifican dos proteínas, **Squint** y **Bozozok** que son muy semejantes a las proteínas que establecen el patrón del mesodermo de anfibios. Squint es un factor paracrino parecido a Nodal que actúa para establecer el patrón del mesodermo, mientras que Bozozok es una proteína de homeodominio similar a Siamosis.

La proteína Bozozok funciona de varias maneras.* En primer lugar, actúa sola, puede reprimir a los genes *bmp*

* Otra semejanza entre los organizadores del anfibio y del pez es que ellos pueden ser duplicados mediante la rotación del cigoto y cambiando la orientación de los microtúbulos (Fluck y col. 1998). Una diferencia en el desarrollo axial de estos grupos es que en los anfibios (véase cap. 10), la placa precordal es necesaria para inducir la formación del cerebro anterior. En *Danio*, la placa precordal parece ser necesaria para la formación de las estructuras neurales ventrales, pero las regiones anteriores del cerebro pueden formarse en su ausencia (Schier y col. 1997; Schier y Talbot 1998).

* Bozozok es un argot Japonés para un joven arrogante sobre una motocicleta. El nombre proviene del fenotipo con una severa *pérdida de función* en el cual un embrión con tan solo cristalino se curva ventralmente sobre la célula vitelínica. Sin embargo, este gen es también denominado *Dharma* (el nombre de un famoso sacerdote Budista) debido a que los embriones con *exceso* de esta proteína (resultado de la inyección de sus mRNA en el embrión) desarrollan enormes ojos y cabeza, pero no tronco o cola. De esta forma se asemejan a las muñecas Dharma japonesas (Yamanaka y col. 1998; Fekany y col. 1999). Entonces este gen regula quizá la conciencia moral también.

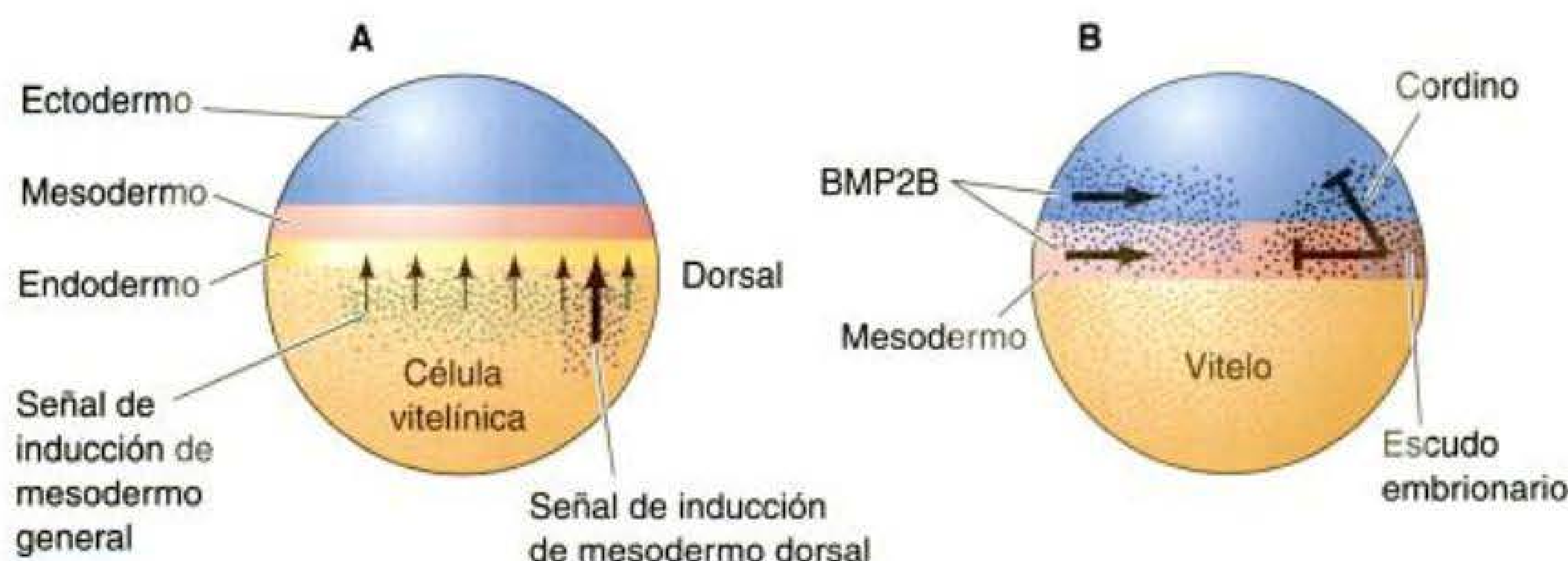


Fig. 11-9. Formación del eje en el embrión del pez cebra. **A.** Antes de la gastrulación, el blastodermo del pez cebra está organizado con el ectodermo presuntivo cerca del polo animal, el mesodermo presuntivo debajo de éste, y el endodermo presuntivo situado por encima de la célula vitelínica. La capa sincitial vitelínica (y posiblemente el endodermo) envía dos señales al mesodermo presuntivo. Una señal (flechas finas) induce el mesodermo, mientras que una segunda señal (flecha gruesa) induce específicamente a una región de mesodermo a convertirse en el mesodermo dorsal (escudo embrionario). **B.** Formación del eje dorsoventral. Durante la gastrulación, el mesodermo ventral secreta BMP2B (flechas) para inducir la diferenciación del mesodermo ventral y lateral y la diferenciación epidérmica. El mesodermo dorsal secreta factores (como Cordino) que bloquean a BMP2B y dorsalizan al mesodermo y al ectodermo (convierten a este último en tejido neural). (Según Schier y Talbot 1998.)

y *wnt* que promoverán funciones ventrales (Solnica-Krezel y Driever 2001). En segundo lugar, Bozozok suprime al gen *vega1* que es activo en todas las otras blastómeras y que actúa reprimiendo al gen *bozozok* (Kawahara y col. 2000). En tercer lugar, Bozozok y Squint actúan individualmente para activar a los genes *cordino* y ellos actúan sinérgicamente para activar a los otros genes organizadores como *goosecoid*, *nogina* y *dickkopf* (fig. 11-10B; Sampath y col. 1998; Gritsman y col. 2000; Schier y Talbot 2001.) Estos genes codifican las proteínas que bloquean a BMP y a Wnts y permiten la especificación del mesodermo dorsal y del ectodermo neural. Por lo tanto, el escudo embrionario es considerado el equivalente al organizador de anfibios y la parte dorsal de la célula vitelínica puede pensarse como el **centro de Nieuwkoop** del embrión del pez.

Además de esta función en la formación del organizador del pez, la señal parecida a Nodal es también crítica para la formación del endodermo Aquí, Squint y Cyclops (otra proteína relacionada a Nodal) induce a los factores de transcripción Bon y GATA5. Estos dos factores de transcripción son coexpresados en el dominio marginal de la blástula tardía y regulan la expresión de los genes corriente abajo que forman el endodermo (Reiter y col. 2001).

La β-catenina materna también inicia una tercera vía, una que coordina los movimientos celulares del mesodermo y del endodermo durante la gastrulación. Las células del mesodermo dorsal derivadas del escudo embrionario generan la notocorda hacia posterior y la placa precordal del mesodermo hacia anterior. Las células anteriores son sumamente móviles y dirigen el mesodermo hacia el embrión. Las células que forman la notocorda no son móviles, pero experimentan extensión convergente similar al proceso visto en *Xenopus*. La actividad de las células anteriores y la extensión convergente de las células notocordales están reguladas por **Stat3**, una subunidad de un factor de transcripción que es regulada a sí misma positivamente por β-catenina (fig. 11-10B; Yamashita y col. 2002). Los embriones inyectados con mor-

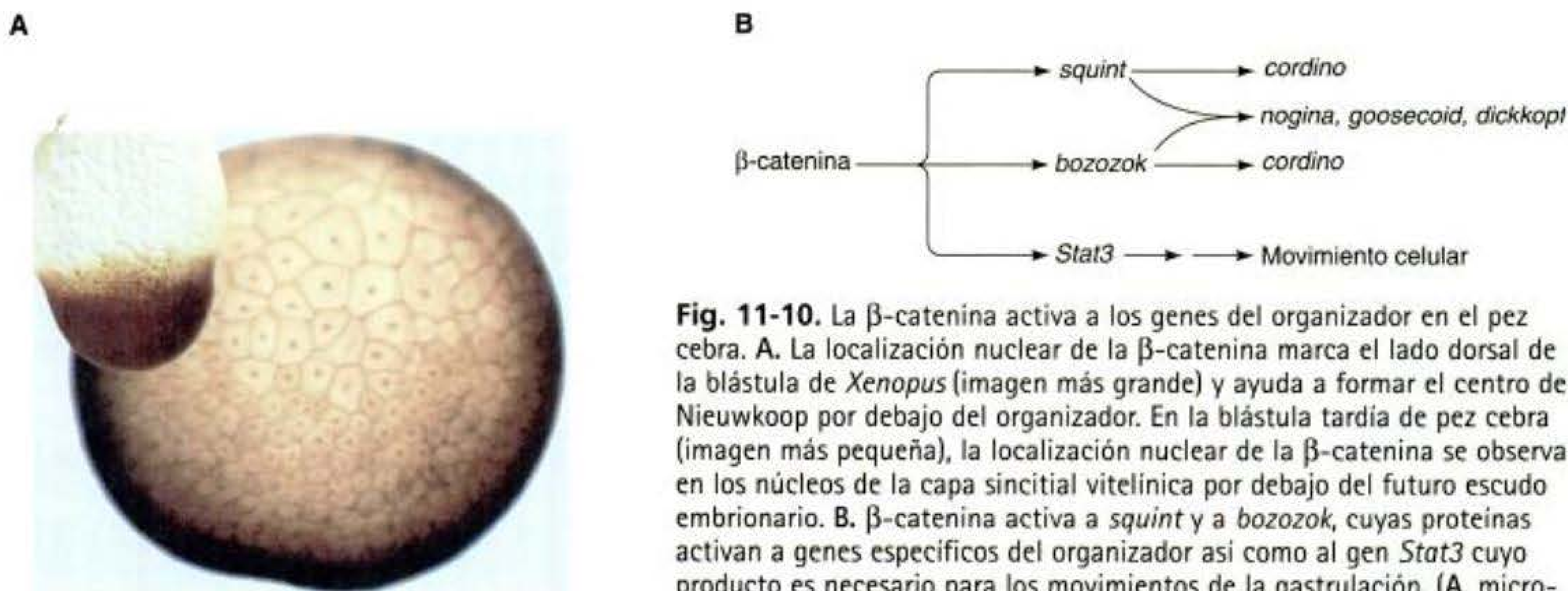


Fig. 11-10. La β-catenina activa a los genes del organizador en el pez cebra. **A.** La localización nuclear de la β-catenina marca el lado dorsal de la blástula de *Xenopus* (imagen más grande) y ayuda a formar el centro de Nieuwkoop por debajo del organizador. En la blástula tardía de pez cebra (imagen más pequeña), la localización nuclear de la β-catenina se observa en los núcleos de la capa sincitial vitelínica por debajo del futuro escudo embrionario. **B.** β-catenina activa a *squint* y a *bozozok*, cuyas proteínas activan a genes específicos del organizador así como al gen *Stat3* cuyo producto es necesario para los movimientos de la gastrulación. (**A**, microfotografía cortesía de S. Schneider; **B**, según Schier y Talbot 2001.)

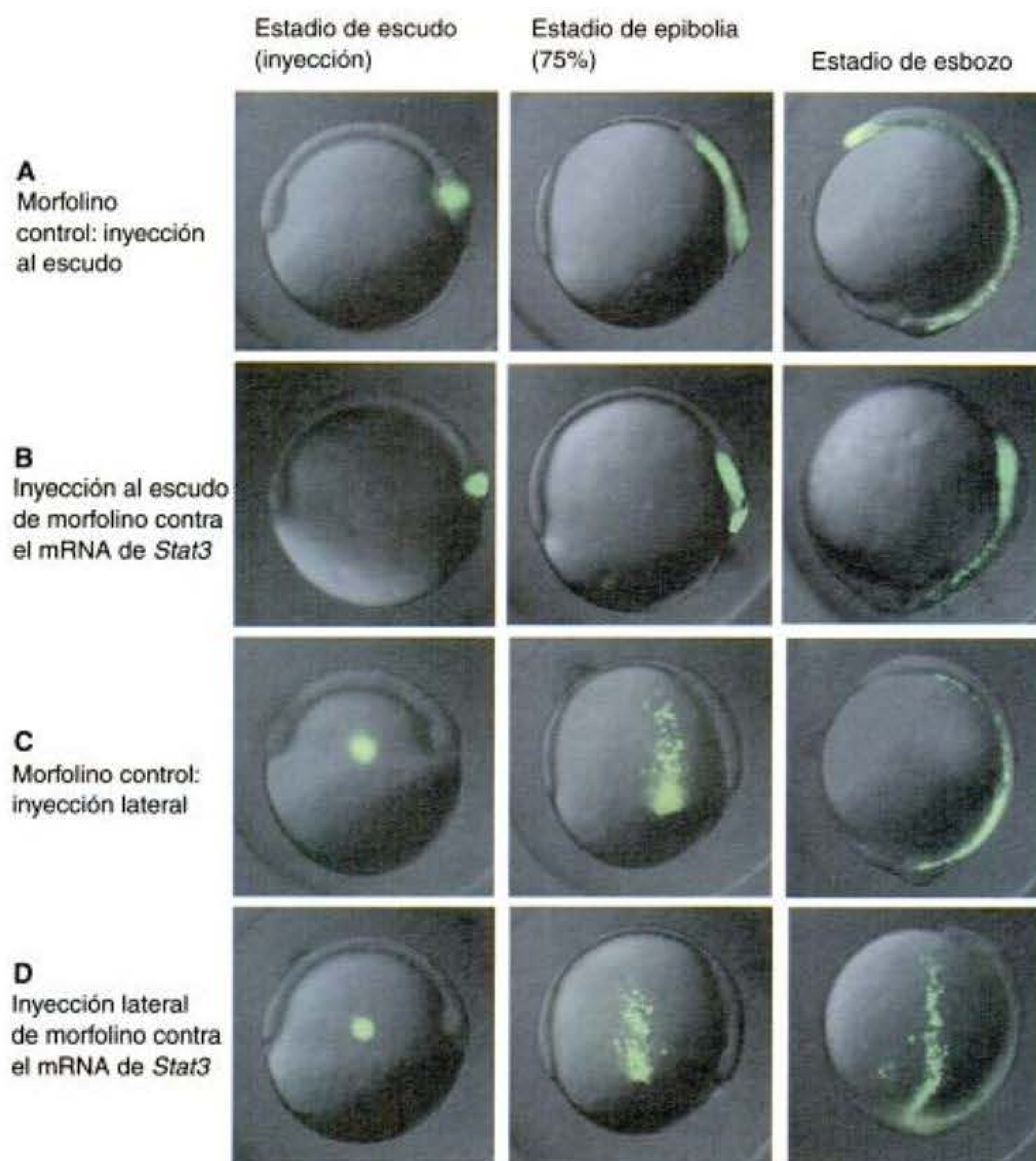


Fig. 11-11. Requerimiento de Stat3 para coordinar los movimientos celulares durante la gastrulación del pez cebra. **A.** Inyección de dextrano fluoresceinado (verde) en el escudo embrionario junto con un morfolino control. El mesodermo axial migra hacia anterior. **B.** Inyección de dextrano fluoresceinado en el escudo junto con un morfolino antisentido contra el mRNA de *Stat3*. La migración de mesodermo axial no se produce. **C.** Inyección de dextrano fluoresceinado y un morfolino control en el mesodermo lateral. El mesodermo lateral experimenta extensión convergente hacia la región paraxial. **D.** Inyección de dextrano fluoresceinado y de un morfolino antisentido *Stat3* en el mesodermo lateral. Aquí el mesodermo no puede experimentar la extensión convergente y se mantiene lateral. (Según Yamashita y col. 2002; microfotografía cortesía de T. Hirano.)

folinos antisentido para Stat3 tenían una cabeza mal posicionada y un eje anteroposterior acortado (fig. 11-11). Sin Stat3, no se producen los movimientos anteriores del mesodermo dorsal ni la convergencia dorsal del mesodermo no axial.

Establecimiento del patrón anteroposterior

Así como en *Xenopus*, el establecimiento del ectodermo neural y del mesodermo en el pez cebra parece ser debido a las proteínas Wnt. La proteína Wnt8 es especialmente importante para el establecimiento del patrón de estas áreas. Los morfolinos contra Wnt8 (evitando su traducción) o la supresión del gen *Wnt8* causan la expansión del ectodermo neural y del mesodermo dorsal a expensas de las regiones ventral y posterior (Levken y col. 2001).

El pez cebra tiene segmentación meroblástica y una enorme célula vitelínica con núcleos sincitiales. Los anfibios como el *Xenopus* tienen segmentación holoblástica y un blastocele. Incluso ambos tipos de embriones utilizan herramientas moleculares semejantes para experimentar la segmentación, la gastrulación y la especificación del eje. Ambos utilizan a las proteínas β-catenina y relacionada a Nodal para formar el mesodermo dorsal y permitirle a este mesodermo expresar los genes del organizador. Ambos utilizan a las BMP y a las Wnt para lateralizar y vegetalizar al embrión, y los genes del organizador codifican proteínas tales como Cordina, Nogina y Dickkopf que antagonizan a las BMP y las Wnt. Además, el pez cebra y *Xenopus* utilizan una proteína de Wnt particular tardíamente en el desarrollo para posteriorizar el ectodermo para formar el tubo neural del tronco. En algunos ejemplos, ellos utilizan a estas proteínas en diferentes modos; pero el resultado es una estructura que es definitivamente reconocible como un embrión de vertebrado.

DESARROLLO TEMPRANO EN LAS AVES

Segmentación en los cigotos de las aves

Desde que Aristóteles fuera el primero en seguir su desarrollo de tres semanas, el pollo doméstico (*Gallus*) ha sido un organismo favorito para los estudios embriológicos. Éste es accesible todo el año y se cría con facilidad. Además, en cualquier temperatura particular, se puede predecir con precisión el estadio de desarrollo. Por lo tanto, puede obtenerse gran número de embriones en el mismo estadio. El embrión de pollo puede ser manipulado quirúrgicamente y debido a que la formación de los órganos del pollo es llevada a cabo por genes y movimientos celulares semejantes a los de la formación de los órganos de mamíferos, el embrión de pollo ha servido con frecuencia como un sustituto económico (y moralmente más aceptable) para embriones humanos

La fecundación del gameto femenino del pollo se produce en el oviducto (trompa de Falopio), antes que la albúmina y la cáscara sean secretadas sobre éste. El huevo (cigoto) es telolecítico (como el del pez), con un peque-

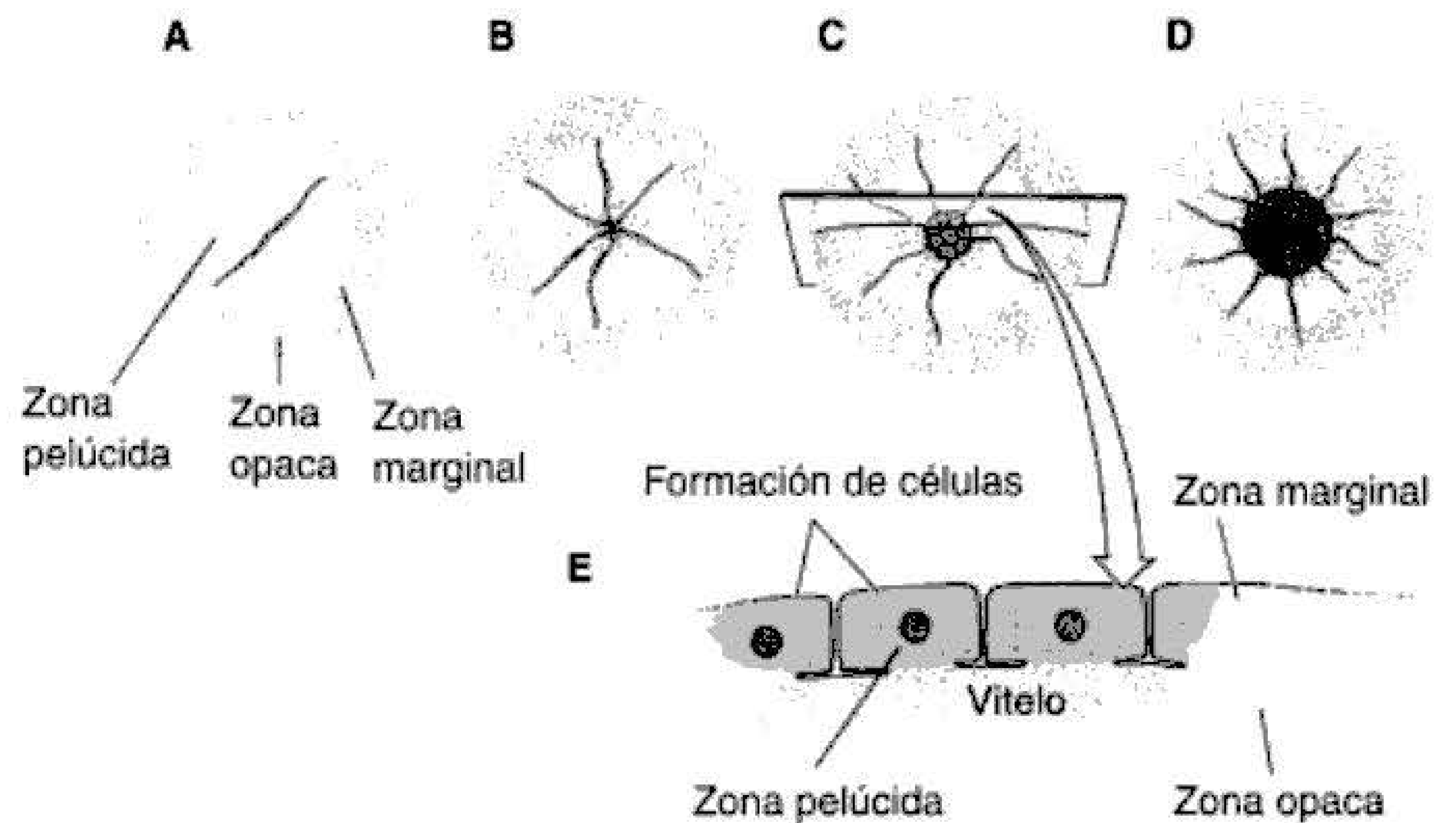


Fig. 11-12. Segmentación meroblástica discoidal en un cigoto de pollo. **A-D.** Cuatro estadios vistos desde el polo animal (el futuro lado dorsal del embrión). **E.** Un embrión en segmentación temprana visto de lado. (Según Bellairs y col. 1978.)

ño disco de citoplasma situado encima de un gran vitelo. Como en el cigoto del pez, los cigotos vitelínicos de las aves experimentan una segmentación meroblástica discoidal. La segmentación se produce solamente en el blastodisco, un pequeño disco de citoplasma de 2-3 mm de diámetro en el polo animal del cigoto. El primer surco de segmentación aparece centralmente en el blastodisco y otros surcos de segmentación siguen para crear un blastodermo de una sola capa (fig. 11-12). Como en el embrión del pez, estas segmentaciones no se extienden al citoplasma vitelínico, de modo tal que las células de segmentación temprana son continuas una con la otra y con el vitelo en sus bases (fig. 11-12E). Por esta razón, las segmentaciones ecuatorial y vertical dividen al blastodermo en un tejido de cinco a seis capas celulares de espesor. Las células llegan a estar unidas por uniones estrechas (Bellairs y col. 1975; Eyal-Giladi 1991). Entre el blastodermo y el vitelo hay un espacio denominado la **cavidad subgerminal** (fig. 11-13A). Este espacio es creado cuando las células del blastodermo absorben agua desde la albúmina ("el huevo blanco") y secretan el fluido entre ellas y el vitelo (New 1956). En este estadio, las células profundas en el centro del blastodermo son eliminadas y mueren, dejando detrás a un **área pelúcida** de una célula de espesor. Esta parte del blastodermo forma la mayor parte del embrión verdadero. El anillo periférico de células del blastodermo que no ha eliminado sus células profundas constituye el **área opaca**. Entre el área pelúcida y el área opaca está una delgada capa de células denominada la **zona marginal** (o **cinturón marginal**) (Eyal-Giladi 1997; Arendt y Nübler-Jung 1999).* Algunas de las células de la zona marginal llegan a ser muy importantes en la determinación del destino celular durante el desarrollo temprano del pollo.

Gastrulación en los embriones de las aves

El hipoblasto

Para el momento en el que la gallina ha puesto un huevo, el blastodermo contiene cerca de 20.000 células. En este momento, la mayoría de las células del área pelúcida se mantienen en la superficie, y forman el epiblasto, mientras que otras células del área pelúcida se han separado de la lámina y migran individualmente hacia la cavidad subgerminal para formar los **islotes de poliinvaginación** (**hipoblasto primario**), un archipiélago de grupos aislados que contienen 5 a 20 células cada uno (fig. 11-13B). Poco tiempo después de esto, una lámina de células desde el margen posterior del blastodermo (distinguido de otras regiones del margen por la **hoz de Koller**, un engrosamiento local) migran hacia anterior y empujan a las células del hipoblasto primario hacia anterior, formando de este modo el **hipoblasto secundario** (Eyal-Giladi y col. 1992; Bertocchini y Stern 2002). Las dos capas de blastodermo resultante (epiblasto e hipoblasto) están unidas en la zona marginal del área opaca y el espacio entre las capas forma un blastocele. Por lo tanto, aunque la forma y la formación del blastodisco difieren de la de la blástula del anfibio, del pez o del equinodermo, las relaciones espaciales generales están conservadas.

El embrión de ave proviene completamente del epiblasto. El hipoblasto no contribuye con ninguna célula al embrión en desarrollo (Rosenquist 1966, 1972). En su lugar, las células del hipoblasto forman porciones de las membranas externas, especialmente del saco vitelino y del pedículo que une la masa vitelina al tubo digestivo endodérmico. Las tres capas germinales del embrión propiamente dicho (más una considerable cantidad de membrana extraembrionaria) son formadas a partir de las células del epiblasto. Los mapas de destino del epiblasto del pollo se muestran en las figuras 11-14 y 1-6 (Schoenwolf 1991).

La línea primitiva

La principal característica estructural de la gastrulación de las aves, reptiles y mamíferos es la **línea (estría) primitiva***. Experimentos de marcación con colorantes y microfotografías electrónicas de barrido indican que las células de la línea primitiva se originan localmente en la región marginal posterior y que las células de otras regiones del embrión no están involucradas en su formación

*Arendt y Nübler-Jung (1999) han sostenido que la región debería ser denominada el *cinturón* marginal para distinguirla de la zona marginal de los anfibios. Aquí se continuará usando la nomenclatura más temprana.

* Aunque, como se vio en el capítulo anterior, recientemente se ha descubierto una estructura semejante a la línea primitiva en ciertos embriones de salamandra (Shook y col. 2002).

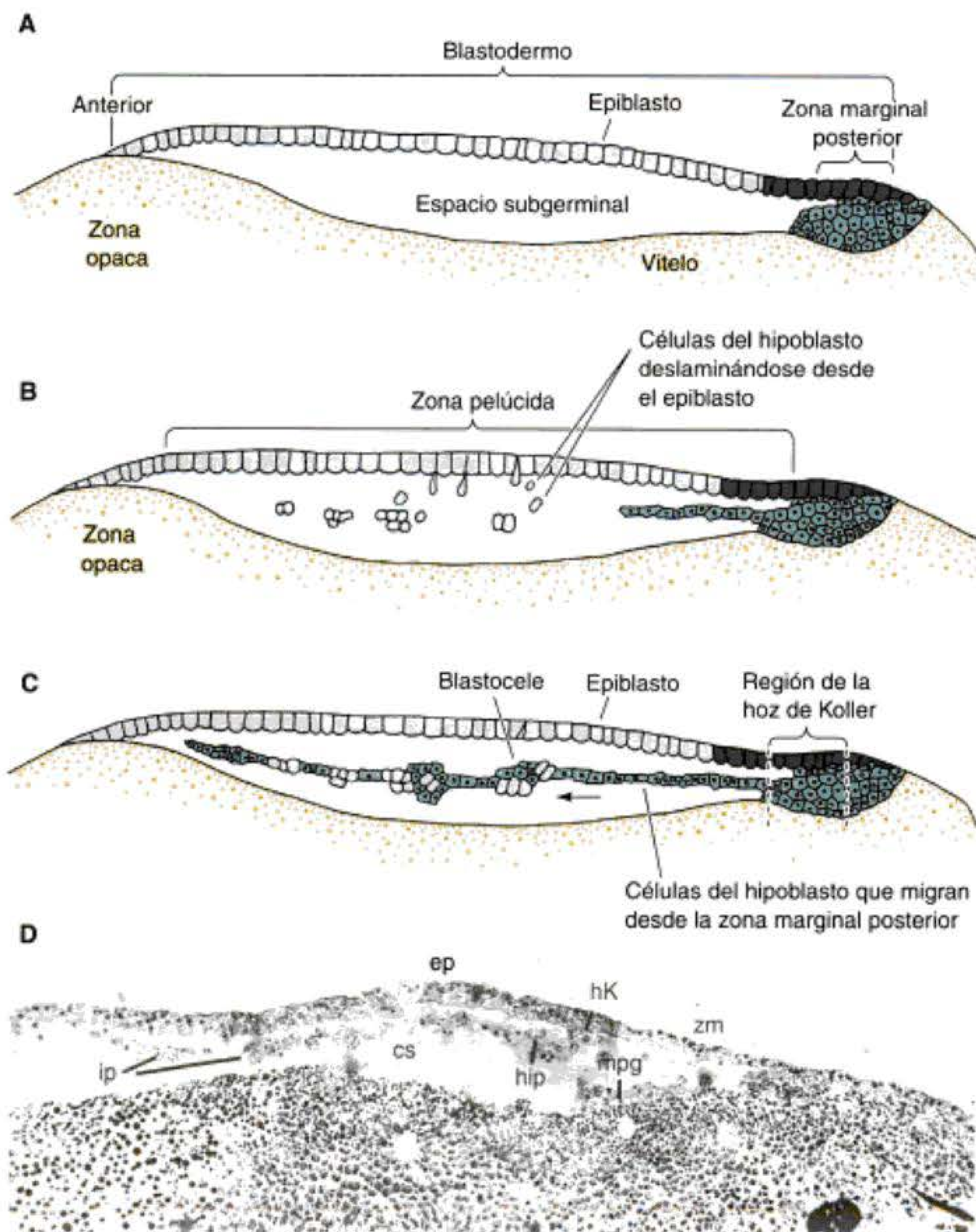


Fig. 11-13. Formación del blastodermo de dos capas del embrión de pollo. **A, B.** Las células del hipoblasto primario se separan individualmente para formar islotes de células por debajo del epiblasto. **C.** Las células del hipoblasto secundario desde el margen posterior (hoz de Koller y células marginales posteriores detrás de éste) migran por debajo del epiblasto (ep) e incorporan las islas de poliinvaginación. A medida que el hipoblasto se mueve hacia anterior, las células del epiblasto se acumulan en la región anterior a la hoz de Koller para formar la línea primitiva. **D.** Esta sección sagital de un embrión cerca del margen posterior muestra una capa superior que consiste en un epiblasto central (ep) que es arrastrado hacia las células de la hoz de Koller (hK) y a la zona marginal posterior (zm). Algunas células se han separado desde el epiblasto para formar islotes de poliinvaginación (ip) de 5 a 20 células cada uno. Estas células estarán unidas por aquellas células del hipoblasto (hip) que migran hacia anterior desde la hoz de Koller para formar la capa más inferior (hipoblasto secundario). (cs, cavidad subgerminal; mpg, margen de la pared germinal.) (De Eyal-Giladi y col. 1992; microfotografía cortesía de H. Eyal-Giladi.)

(Lawson y Schoenwolf 2001a,b). La línea es primero visible como un engrosamiento del epiblasto en la zona marginal posterior, justo anterior a la hoz de Koller (fig. 11-14A). Este engrosamiento es iniciado por un incremento en la altura (espesor) de las células que forman el centro de la línea primitiva. Las células presuntivas de la línea alrededor de éstas se vuelven globulares y móviles y parecen digerir la matriz extracelular subyacente a ellas. Este proceso permite su intercalación (mediolateralmente) y extensión convergente. Esta extensión convergente es responsable del avance de la línea primitiva: una duplicación en la longitud de la línea primitiva es acompañada por una concomitante reducción de su ancho a la mitad. Aquellas células que iniciaron la formación de la línea primitiva (es decir, que estaban en la línea media del epiblasto recubriendo la hoz de Koller) aparecen migrando hacia el extremo anterior y pueden constituir una población celular inalterable que dirige los movimientos de las células del epiblasto hacia la línea.

A medida que las células convergen para formar la línea primitiva, se forma una depresión dentro de la línea. Esta depresión es denominada el **surco primitivo**, y sirve como una apertura a través de la cual las células migrantes pasan hacia el blastocele. Por lo tanto, el surco primitivo es análogo al blastoporo de los anfibios. En el extremo anterior de la línea primitiva se encuentra un engrosamiento regional de células denominado **nódulo (o nodo) primitivo** o **nódulo de Hensen**. El centro de este nódulo contiene una depresión con forma de embudo (a veces denominada **fosa primitiva**) a través de la cual las células pueden pasar hacia el blastocele. El nódulo de Hensen es el equivalente funcional del labio dorsal del blastoporo de anfibios (es decir, el organizador) y del escudo embrionario del pez (Boettger y col. 2001).

Las primeras células que ingresan a través de la línea primitiva y hacia el blastocele son los precursores endodérmicos desde el epiblasto (fig. 11-14B; Vakaet 1984; Bellairs 1986; Eyal-Giladi y col. 1992). Estas células experimentan una transformación epitelial a mesenquimática y la lámina basal por debajo de ellas desaparece. A medida que estas células entran a la línea primitiva, la línea se alarga hacia la futura región de la cabeza. La división celular aumenta la longitud producida por la extensión convergente y algunas de las células de la porción anterior del epiblasto contribuyen a la formación del nódulo de Hensen (Streit y col. 2000; Lawson y Schoenwolf 2001b).

Al mismo tiempo, las células del hipoblasto secundario continúan migrando hacia anterior desde el margen posterior del blastodermo. La elongación de la línea pri-

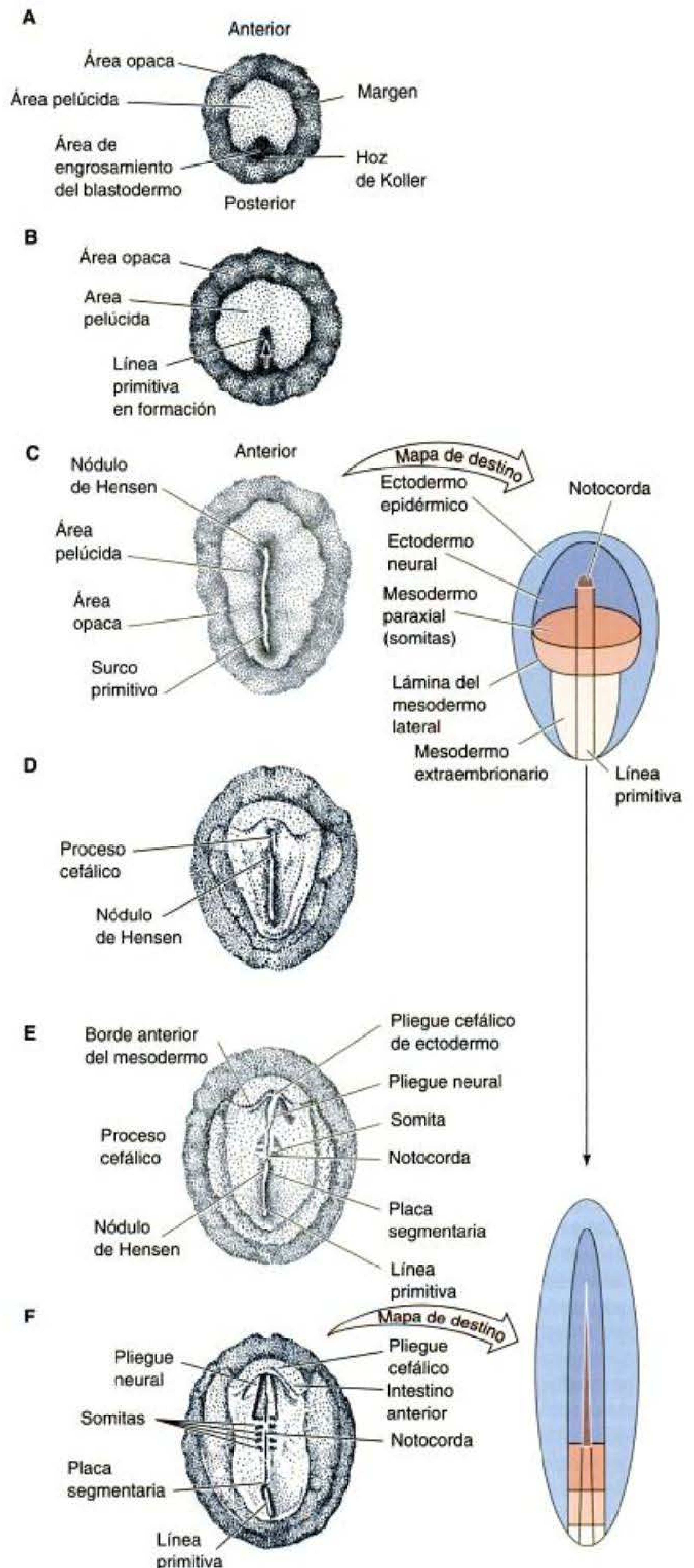


Fig. 11-14. Movimientos celulares de la línea primitiva del embrión de pollo. **A-C.** Vista dorsal de la formación y alargamiento de la línea primitiva. Se observa el blastodermo **A** a las 3-4 horas, **B**, a las 7-8 horas y **C** a las 15-16 horas después de la fecundación. **D-F.** Formación de la notocorda y de los somitas mesodérmicos a medida que se produce la regresión de la línea primitiva, mostrada **D** a las 19-22 horas, **E** a las 23-24 horas y **F** en el estadio de cuatro somitas. Se muestran los mapas de destino del epiblasto del pollo para dos estadios, el estadio de línea primitiva definitiva **C** y el de neurulación **F**. En **F**, el endodermo ya ha ingresado por debajo del epiblasto y se observa en la línea media la extensión convergente. (Adaptado de varias fuentes, especialmente Spratt 1946 y Smith y Schoenwolf 1998.)

mitiva parece ser coextensiva con la migración hacia anterior de estas células del hipoblasto secundario y el hipoblasto dirige el movimiento de la línea primitiva (Waddington 1933; Foley y col. 2000). La línea finalmente se extiende hasta un 60 a 75% de la longitud del área pelúcida.

La línea primitiva define los ejes del embrión. Ésta se extiende desde *posterior* hacia *anterior*; las células en migración entran a través de su lado *dorsal* y se mueven hacia su lado *ventral*; y ésta separa la porción *izquierda* de la *derecha* del embrión. Aquellos elementos cercanos a la línea serán las estructuras **mediales** (central), mientras que los alejados de ésta serán las estructuras **distales** (lateral) (fig. 11-14C-E).

En cuanto la línea primitiva se ha formado, las células del epiblasto comienzan a migrar a través de ésta y hacia el blastocele (fig. 11-15). La línea primitiva debido a esto tiene una población celular que cambia continuamente. Las células que migran a través del extremo anterior pasan hacia el blastocele y migran hacia el extremo anterior, formando el intestino anterior, el mesodermo de la cabeza y la notocorda; las células que pasan a través de las porciones más posteriores de la línea primitiva dan origen a la mayor parte de los tejidos endodérmico y mesodérmico (Schoenwolf y col. 1992). A diferencia del mesodermo de *Xenopus*, que migra como una lámina de células hacia el blastocele, las células que entran hacia el interior del embrión de ave ingresan como células individuales después de experimentar una transformación epitelial a mesenquimática. Se piensa que el desensamblaje de la lámina basal y la liberación de las células hacia el embrión en el nódulo de Hensen y a través de la línea primitiva es llevado a cabo por el **factor scatter** (dispersar), una

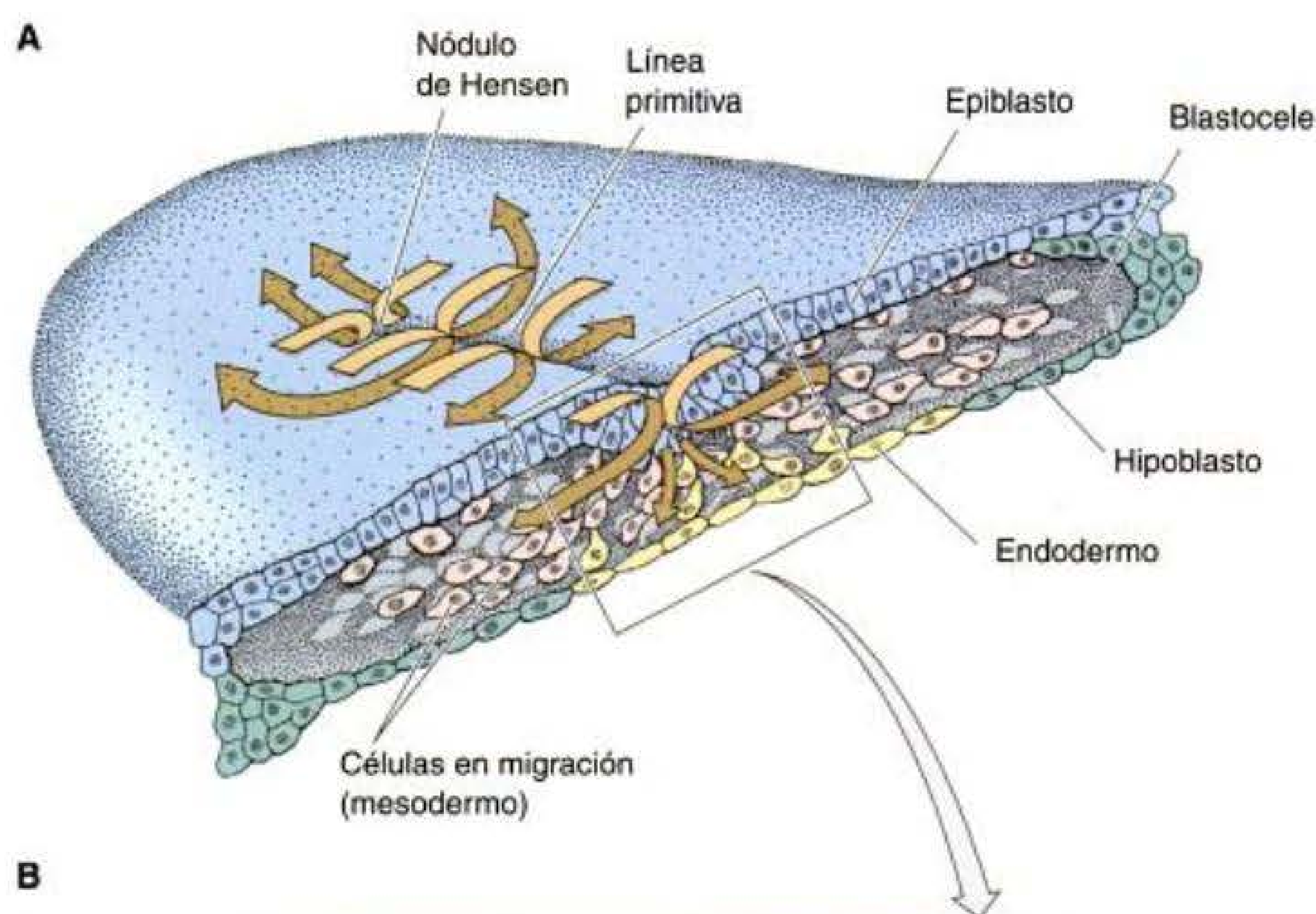




Fig. 11-15. Migración de las células endodérmicas y mesodérmicas a través de la línea primitiva. **A.** Estereograma de un embrión de pollo gastrulando, que muestra las relaciones de la línea primitiva, las células en migración y las dos capas originales del blastodermo. La capa más inferior se convierte en un mosaico de células hipoblásticas y endodérmicas; las células hipoblásticas finalmente se separan para formar una capa por debajo del endodermo y contribuir al saco vitelino. **B.** Microfotografía electrónica de barrido que muestra las células del epiblasto cuando pasan hacia el blastocele y extienden sus extremos apicales para convertirse en células de botella. (A, de Solursh y Revel 1978, microfotografía cortesía de M. Solursh; B, según Balinsky 1975.)

proteína de 190-kDa secretada por las células a medida que ellas entran a la línea (Stern y col. 1990; Deluca y col. 1999). El factor scatter puede convertir las láminas epiteliales en células mesenquimáticas de varios modos, y probablemente está involucrado en la regulación en menos de la expresión de la E-cadherina y en evitar el funcionamiento de la E-cadherina.

MIGRACIÓN A TRAVÉS DE LA LÍNEA PRIMITIVA: FORMACIÓN DE ENDODERMO Y MESODERMO. Las primeras células en migrar a través del nódulo de Hensen son las destinadas a convertirse en el endodermo faríngeo del intestino anterior. Una vez dentro del blastocele, estas células endodérmicas migran hacia el extremo anterior y finalmente desplazan a las células del hipoblasto, haciendo que las células del hipoblasto sean reducidas a una región en la porción anterior del área pelúcida. Esta región, la **medialuna germinal**, no forma ninguna estructura embrionaria, pero contiene los precursores de las células germinales, que posteriormente migrarán a través de los vasos sanguíneos hacia las gónadas (véase cap. 19). Las siguientes células en entrar al blastocele a través del nódulo de Hensen también se mueven hacia el extremo anterior, pero no se desplazan tan lejos ventralmente como las células endodérmicas presuntivas del intestino anterior. En su lugar, se mantienen entre el endodermo y el epiblasto para formar el **mesénquima cefálico** y el **mesodermo de la placa precordal** (véase Psychoyos y Stern 1996). Todas estas células que ingresan inicialmente se desplazan hacia el extremo anterior, empujando la región anterior de la línea media del epiblasto para formar el **proceso cefálico** (fig. 11-16). Por lo tanto, la cabeza del embrión del ave se forma en una posición anterior (rostral) al nódulo de Hensen. Las siguientes células en migrar a través del nódulo de Hensen se convierten en la población de las células del **cordamesodermo** (notocorda). Estas células se extienden hasta el cerebro medio presuntivo, donde se encuentran con la placa precordal. El cerebro posterior (rombencéfalo) y el tronco se forman desde el cordamesodermo a nivel del nódulo de Hensen y caudal a éste.

Mientras tanto, las células continúan migrando hacia adentro a través de las porciones laterales de la línea primitiva. A medida que entran al blastocele, estas células se separan en dos capas. La capa profunda se une al hipoblasto a lo largo de su línea media y desplaza a las células del hipoblasto hacia los lados. Estas células con movimientos profundos dan origen a todos los órganos endodérmicos del embrión así como a la mayoría de las membranas extraembrionarias (el hipoblasto forma el resto). La segunda capa migratoria se extiende entre este endodermo y el epiblasto, formando una capa de células sueltas. Esta capa media de células genera las porciones mesodérmicas del embrión y el mesodermo que reviste a las membranas extraembrionarias. Hacia las 22 horas de incubación, la mayoría de las células endodérmicas presuntivas están en el interior del embrión, aunque las células mesodérmicas presuntivas continúan migrando hacia adentro por un tiempo más largo.

REGRESIÓN DE LA LÍNEA PRIMITIVA. Ahora comienza una nueva fase de la gastrulación. Mientras continúa la ingresión del mesodermo, la línea primitiva comienza una regresión, desplazando el nódulo de Hensen desde cerca del centro del área pelúcida hacia una posición más posterior (fig. 11-16). Éste deja a su paso el eje dorsal del embrión y la notocorda. A medida que el nódulo se desplaza hacia el extremo posterior, es establecida la notocorda, que comienza a nivel del futuro cerebro medio. Mientras que la porción anterior (cabeza) de la notocorda es formada por la ingresión de las células a través del nódulo de Hensen, la notocorda posterior (tronco) (después del somita 17 en el pollo) se forma desde la condensación de tejido mesodérmico que ha ingresado a través de la línea primitiva (es decir, no lo hace a través del nódulo de Hensen). Esta porción de la notocorda se extiende hacia el extremo posterior para formar la cola del embrión (Le Douarin y col. 1996). Por último, el nódulo de Hensen experimenta una regresión hacia su posición en el extremo posterior y forma la región anal. En este momento, todas las células del endodermo y del mesodermo presuntivos han entrado al embrión y el epiblasto está compuesto en su totalidad de células del ectodermo presuntivo.

Como un resultado de esta secuencia en la que se establecen el mesodermo cefálico y la notocorda, los embriones de aves (y mamíferos) presentan un gradiente de madurez del desarrollo distinto desde anterior hacia posterior. Mientras que las células de las porciones posteriores del embrión están experimentando la gastrulación, las células en el extremo anterior ya comienzan a formar órganos (véase Darnell y col. 1999). Durante varios días siguientes, el extremo anterior del embrión está más avanzado en su desarrollo (tiene una "ventaja", si usted quiere) que el extremo posterior.

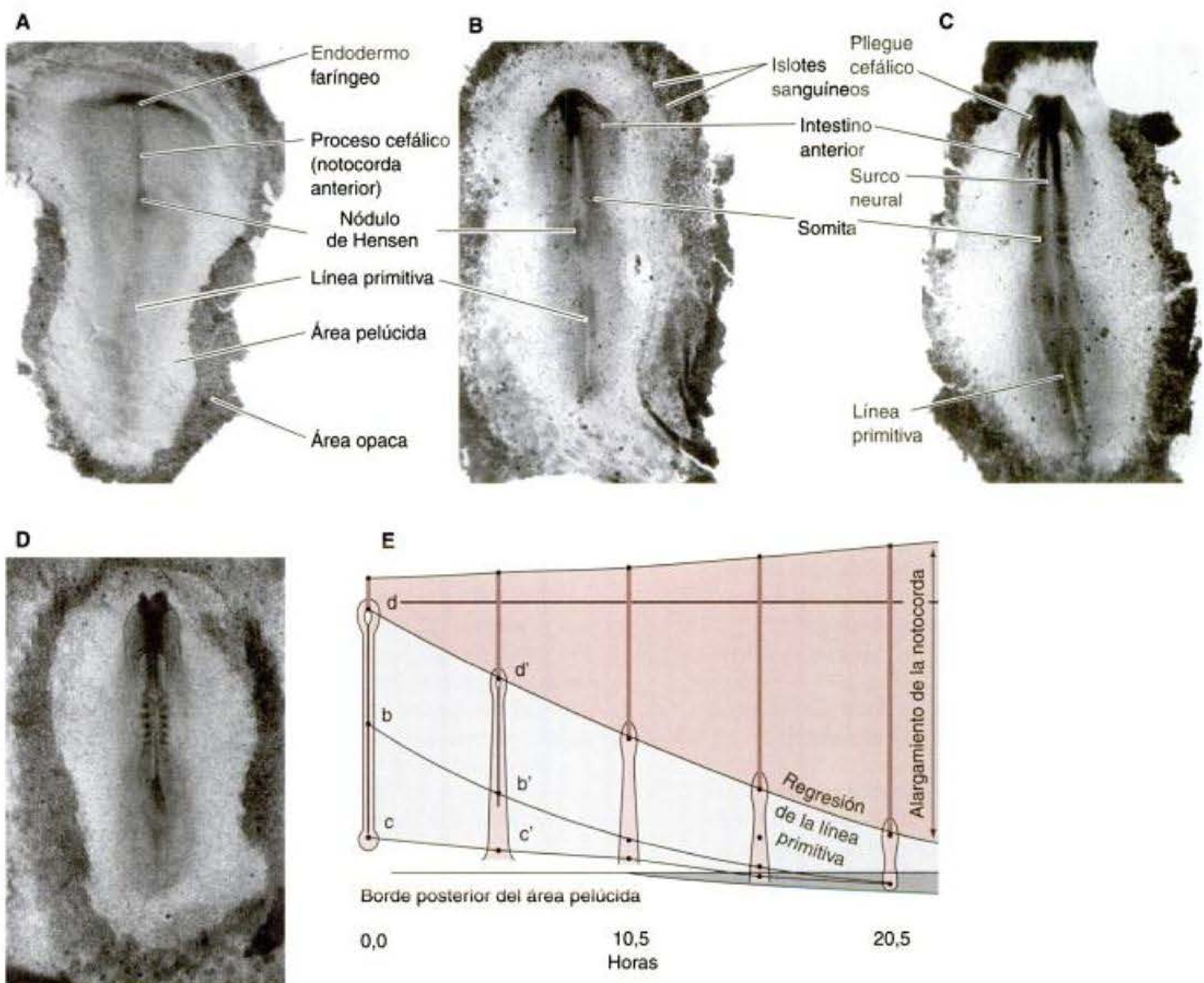


Fig. 11-16. Gastrulación del pollo 24-48 horas después de la gastrulación. **A.** La línea primitiva en su extensión completa (24 horas). El proceso cefálico puede ser visto extendiéndose desde el nódulo de Hensen. **B.** Estadio de dos somitas (25 horas). Se observa el endodermo faríngeo en el extremo anterior, mientras que la notocorda empuja al proceso cefálico hacia abajo. La línea primitiva está en regresión. **C.** Estadio de cuatro somitas (27 horas). **D.** A las 28 horas, la línea primitiva ha experimentado una regresión hasta la porción caudal del embrión. **E.** Regresión de la línea primitiva, que deja la notocorda en su camino. Se siguieron varios puntos de la línea (representados por letras) después de que ésta alcanzó su máxima longitud. El eje *x* (tiempo) representa a las horas después de haber alcanzado la máxima longitud (la línea de referencia es de cerca de 18 horas de incubación). (**A-D**, microfotografías cortesía de K. Linask; E, según Spratt 1947.)

Epibolia del ectodermo

Mientras que las células del mesodermo y del endodermo presuntivo se están desplazando hacia adentro, los precursores ectodérmicos proliferan y migran rodeando al vitelo mediante epibolia. El cercamiento del vitelo por el ectodermo (otra vez asemejándose a la epibolia del ectodermo de anfibios) es una tarea Hercúlea que para completarse toma casi cuatro días. Esta involucra la producción continua de nuevo material celular y la migración de las células del ectodermo presuntivo a lo largo de la parte inferior de la membrana vitelina (New 1959; Spratt 1963). Curiosamente, solo las células del margen externo del área opaca se unen firmemente a la membrana vitelina. Estas células son intrínsecamente diferentes de las otras células del blastodermo, debido a que ellas pueden extender enormes procesos citoplasmáticos (500 µm) sobre la membrana vitelina. Estos filopodios alargados se cree que son el aparato locomotor de estas células marginales, por el cual ellas arrastran a las otras células ectodérmicas alrededor del vitelo (Schlesinger 1958). Los filopodios parecen unirse a la fibronectina, una proteína laminar que es un componente de la membrana vitelina del pollo (véase cap. 6). Si el contacto entre las células marginales y la fibronectina es alterado experimentalmente (mediante el agregado de un polipéptido soluble semejante a la fibronectina), los filopodios se retraen y se detiene la migración epidérmica (Lash y col. 1990).

Por lo tanto, cuando la gastrulación se acerca al final, el ectodermo ha rodeado al vitelo, el endodermo ha reemplazado al hipoblasto y el mesodermo se ha posicionado entre estas dos regiones. Se han identificado muchos procesos involucrados en la gastrulación de las aves, pero ahora se están comenzando a entender los mecanismos por los cuales muchos de estos procesos son llevados a cabo.

SITIO WEB 11.2 **Heterogeneidad de las células del epiblasto (Epiblast cell heterogeneity).** Aunque el epiblasto temprano parece uniforme, diferentes células tienen distintas moléculas sobre sus superficies celulares. Esta variabilidad les permite a algunas de ellas mantenerse en el epiblasto mientras que otras migran hacia el embrión.

VADE MECUM[2] **Desarrollo del pollo (Chick development).** Ver estas películas de modelos tridimensionales de la segmentación y de la gastrulación del pollo ayudará a entender estos fenómenos.
[Hacer clic sobre Early-Chick]

Formación del eje en el embrión de pollo

Mientras que la formación de los ejes del cuerpo es llevada a cabo durante la gastrulación, la especificación se produce más temprano, durante el estadio de segmentación.

El papel del pH en la formación del eje dorsoventral

El eje dorsoventral (dorso-vientre) es crítico para la formación del hipoblasto y para el posterior desarrollo del embrión. Este eje es establecido cuando las células del blastodermo en segmentación constituyen una barrera entre la albúmina básica (pH 9,5) por arriba del blastodisco y la cavidad subgerminal ácida (pH 6,5) por debajo de éste. Agua e iones sodio son transportados desde la albúmina a través de las células y hacia la cavidad subgerminal, creando una diferencia de potencial de membrana de 25 mV a través de la capa celular epiblástica (positiva en el lado ventral de las células). Este proceso distingue dos lados del epiblasto: un lado que da a la albúmina básica y negativa, que se convierte en el lado dorsal, y otro lado que da al fluido ácido y positivo de la cavidad subgerminal, que llega a ser el lado ventral. Este eje puede ser invertido experimentalmente mediante la inversión del gradiente de pH o mediante la inversión de la diferencia de potencial a través de la capa celular (revisión en Stern y Canning 1988).

El papel de la gravedad en la formación de eje anteroposterior

La conversión del blastodermo simétrico radialmente a una estructura simétrica bilateralmente es determinada por la gravedad. A medida que el óvulo pasa a través del tracto reproductivo de la gallina, es rotado por cerca de 20 horas en la glándula de la cáscara. Este movimiento giratorio, a una velocidad de 10 a 12 revoluciones por hora, mueve al vitelo de modo tal que sus componentes más livianos se depositan bajo un lado del blastodermo. Esta inclina hacia arriba el extremo del blastodermo y este extremo se convierte en la porción posterior del embrión –la parte donde comienza la formación de la línea primitiva (fig. 11-17; Kochav y Eyal-Giladi 1971; Eyal-Giladi y Fabian 1980).

No se conocen las interacciones que hacen que esta porción del blastodermo se convierta en la **zona marginal posterior (ZMP)** ni tampoco las que inician la gastrulación. En un principio, la capacidad para iniciar una línea primitiva se encuentra a lo largo de la zona marginal y si el blastodermo es separado en partes, cada una con su propia zona marginal, cada parte formará su propia línea primitiva (Spratt y Haas 1960). Sin embargo, una vez que se ha formado la ZMP, ésta controla a otras regiones de la zona marginal. Estas células de la ZMP no solo inician la gastrulación, sino que también evitan que otras regiones del margen formen su propia línea primitiva* (Khaner y Eyal-Giladi 1989; Eyal-Giladi y col. 1992). Estudios recientes (Bertocchini y Stern 2002) sugieren que la rotación lleva a la formación del hipoblas-

* Los investigadores iniciales (Waddington 1932) pensaban que el hipoblasto inducía la formación de la línea primitiva y le proporcionaban al embrión la polaridad anteroposterior. Sin embargo, Khaner (1995) rotó al epiblasto con respecto al hipoblasto en diferentes estadios del desarrollo del pollo y demostró que el epiblasto inicia la formación de la línea primitiva y mantiene su polaridad independientemente de la orientación del hipoblasto.

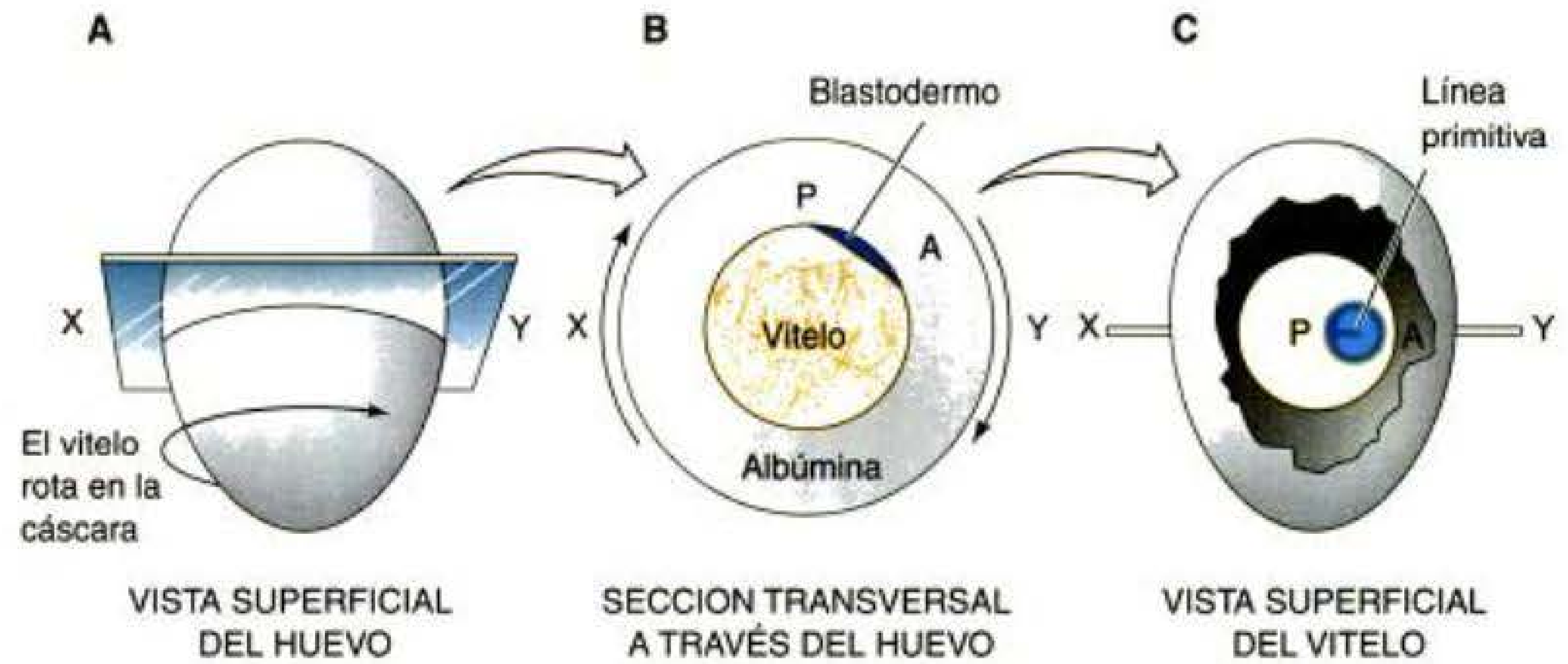


Fig. 11-17. Especificación del eje anteroposterior del pollo por gravedad. **A.** La rotación en la glándula de la cáscara da como resultado (**B**) que los componentes del vitelo sean empujados hacia arriba sobre un lado del blastodermo. **C.** Esta región más elevada se convierte en el extremo posterior del embrión. (Según Wolpert y col. 1998.)

to secundario en la zona y que las células del hipoblasto 2° empujan y apartan al hipoblasto 1° que secreta Cerberus. A medida que las células del hipoblasto 1° son alejadas de la zona marginal posterior, la ausencia de Cerberus le permite a la proteína Nodal expresarse en la ZMP.

Ahora parece evidente que la ZMP contiene células que actúan como el equivalente al centro de Nieuwkoop del anfibio. Cuando se coloca en la región *anterior* de la zona marginal, un injerto de tejido de la zona marginal *posterior* (posterior a la hoz de Koller y sin incluirla) es capaz de inducir una línea primitiva y un nódulo de Hensen sin contribuir con células para estructuras (Bachvarova y col. 1998; Khaner 1998). Como en el centro de Nieuwkoop de anfibios, se piensa que esta región es el lugar de localización de la β-catenina en el núcleo y coincide una señal de la familia TGF-β. β-catenina es hallada a lo largo de la zona marginal (pero no en las células del interior), mientras que la expresión de *Vg1* se observa solamente en las células posteriores de esta región (Mitrani y col. 1990; Hume y Dodd 1993; Seleiro y col. 1996). La superposición de estas dos regiones constituyen el centro de Nieuwkoop de la zona marginal posterior (fig. 11-18; Boettger y col. 2001).

El "organizador" del embrión de pollo se forma justo por delante del centro de Nieuwkoop. El epiblasto y las células de la capa media en la porción anterior de la hoz de Koller se convierten en el nódulo de Hensen (Bachvarova y col. 1998). Las porciones laterales de la hoz de Koller contribuyen a la porción posterior de la línea primitiva (fig. 11-19). El nódulo de Hensen se conocía desde hace mucho tiempo como el equivalente al labio dorsal del blastoporo del anfibio, debido a que es 1) el sitio donde comienza la gastrulación, 2) la región cuyas células se convierten en cordamesodermo y 3) la región cuyas células pueden organizar un segundo eje embrionario cuando son trasplantadas hacia otras localizaciones de la gástrula (fig. 11-20; Waddington 1933; 1934; Dias y Schoenwolf 1990).

La expresión génica en el organizador del pollo puede categorizarse en dos grupos de genes (Lawson y col. 2001). El primer grupo contiene los genes que se expresan en primer lugar en la porción posterior de la hoz de Koller y que probablemente ayudan a formar el centro de Nieuwkoop. Estos genes, que incluyen a *Vg1* y a *nodal*, aparecen luego a lo largo de toda la longitud de la línea primitiva (fig. 11-21). Estudios recientes (Skromne y Stern 2002) han demostrado que Vg1 juega un papel crucial en la formación de la línea primitiva y si Vg1 es expresado ectópicamente en la zona marginal *anterior*, se formará allí un eje secundario.

El segundo grupo de genes comprende a aquellos cuya expresión está limitada a la porción anterior de la línea primitiva y finalmente al nódulo de Hensen. Estos genes incluyen a *cordina* y *sonic hedgehog*. Como sucede en

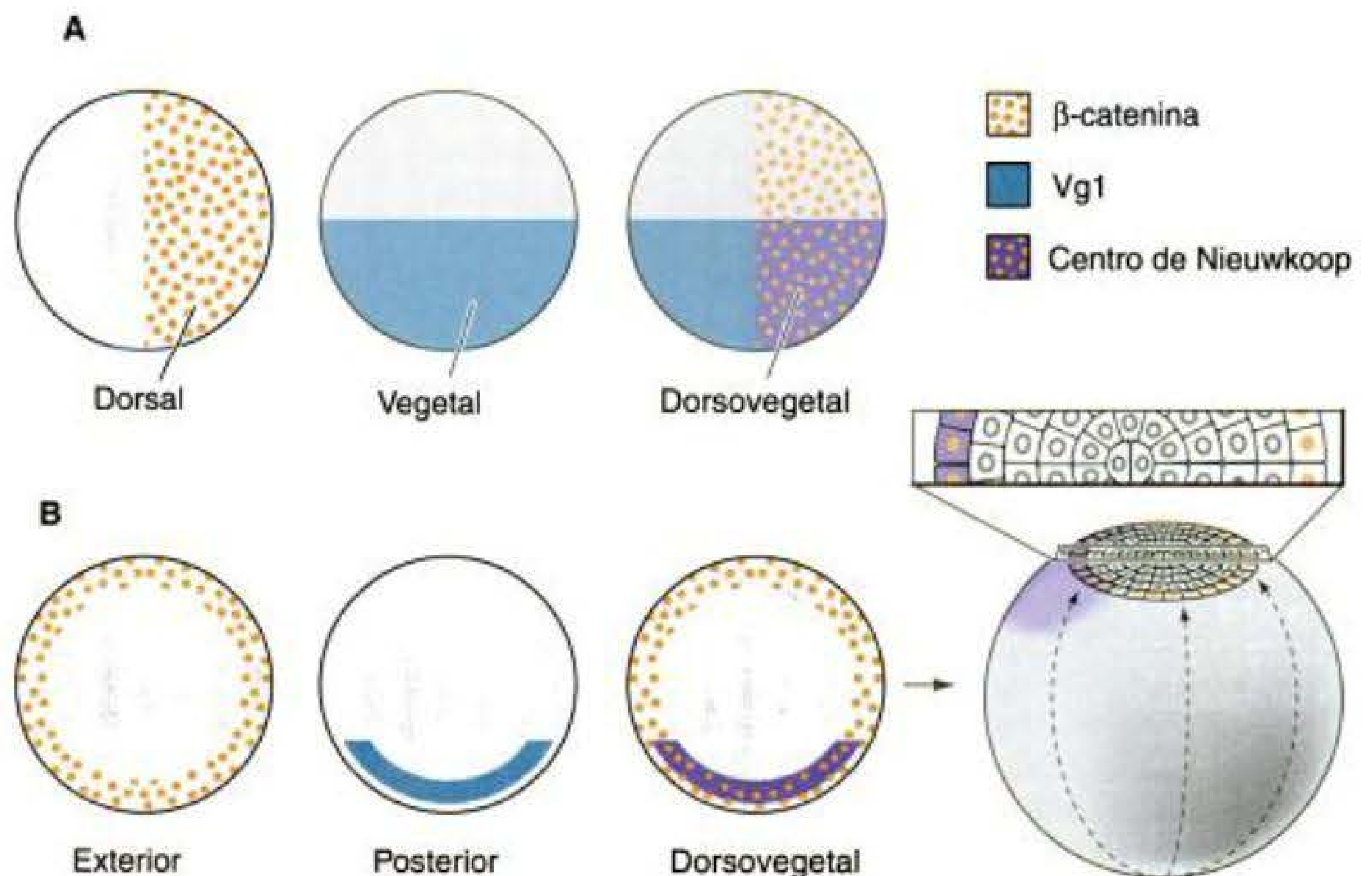


Fig. 11-18. Formación del centro de Nieuwkoop en ranas y pollos. **A.** Formación del centro de Nieuwkoop en *Xenopus*. La gravedad y el sitio de entrada del espermatozoide determinan la localización de la β-catenina en la región dorsal. Las células vegetales secretan Vg1. La superposición se convierte en el centro de Nieuwkoop. **B.** En el pollo, β-catenina es hallada en las células externas del blastodisco (que, al estar más lejos del centro y adyacentes al vitelo, son equivalentes a las células ventrales del embrión de rana). Las células que producen Vg1 están restringidas (probablemente por gravedad) a las células presuntivas posteriores del blastodermo. La superposición se convierte en el centro de Nieuwkoop. (Según Boettger y col. 2001.)

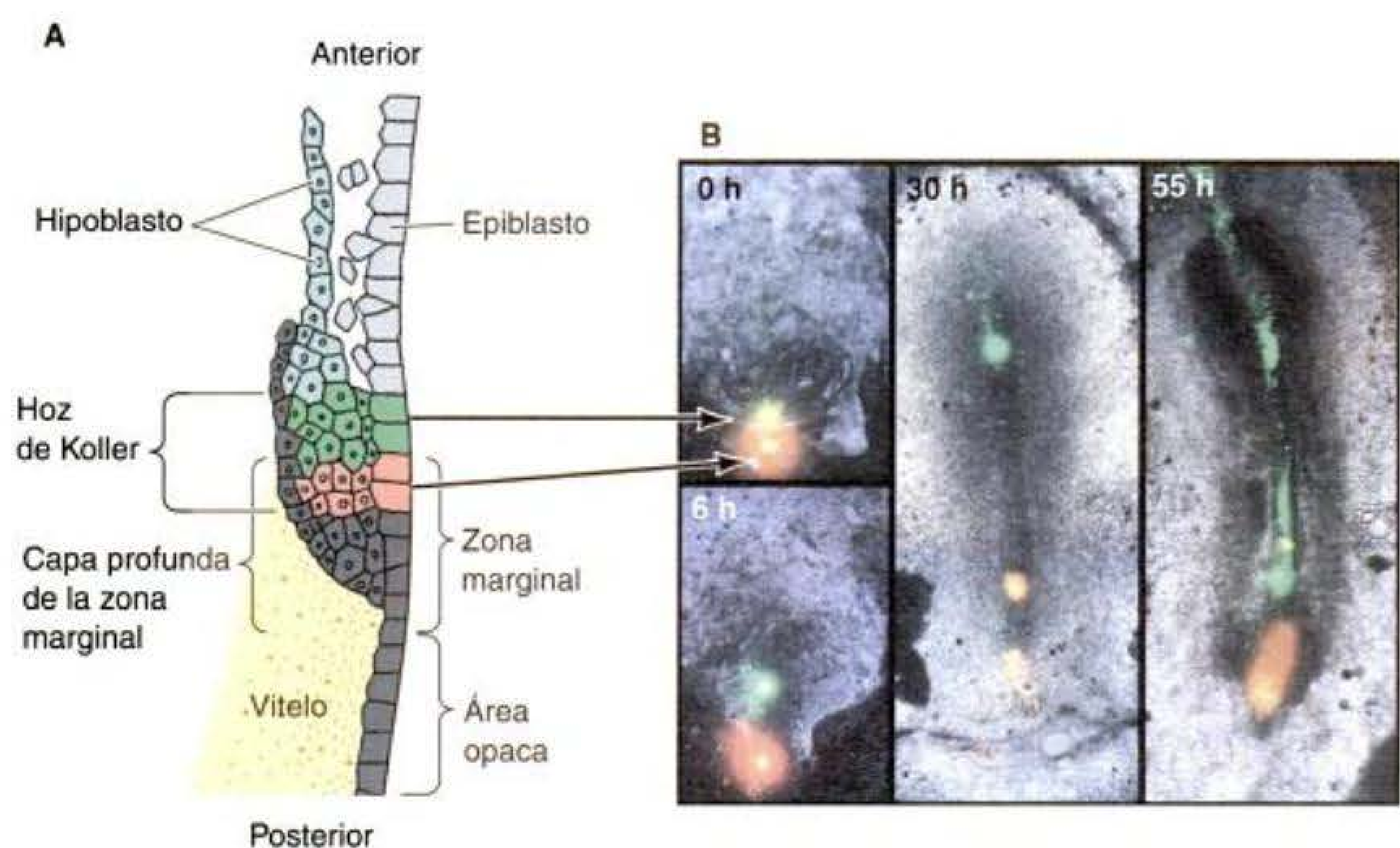


Fig. 11-19. Formación del nódulo de Hensen a partir de la hoz de Koller. **A.** Diagrama del extremo posterior de un embrión temprano (prelínea primitiva), que muestra en las fotografías a las células marcadas con colorantes fluorescentes. **B.** Justo antes de la gastrulación, las células en el extremo anterior de la hoz de Koller (el epiblasto y la capa media) fueron marcadas con colorante verde. Las células de la porción posterior de la hoz de Koller fueron marcadas con colorante rojo. A medida que las células migraron, las células anteriores formaron el nódulo de Hensen y sus derivados notocordales. Las células posteriores formaron la región posterior de la línea primitiva. En cada microfotografía está indicado el tiempo después de la inyección de colorante. (Según Bachvarova y col. 1998; microfotografías cortesía de R. F. Bachvarova.)

todos los vertebrados, el mesodermo dorsal es capaz de inducir la formación del sistema nervioso central en el ectodermo que lo recubre. Las células del nódulo de Hensen y sus derivados actúan como el organizador de anfibios y secretan las proteínas Cordina, Nogina y Nodal. Estas proteínas antagonizan a las BMP y dorsalizan al ectodermo y al mesodermo (fig. 11-22). Sin embargo, la represión de la señal de BMP no parece ser suficiente para la inducción neural (véase Streit y Stern 1999). Los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) sintetizados en las células precursoras del nódulo de Hensen justo previo a la gastrulación parecen ser críticos para preparar al epiblasto para generar fenotipos neuronales* (Alvarez y col. 1998; Storey y col. 1998; Streit y col. 2000).

* Una condición previa para la capacidad del sistema BMP-cordina para neuralizar al ectodermo es que las células ectodérmicas presuntivas disociadas (sin inducir) se convertirán en neurales. En los embriones de pollo, sin embargo, las células del epiblasto disociado se desarrollan a músculo (George-Weinstein y col. 1996).

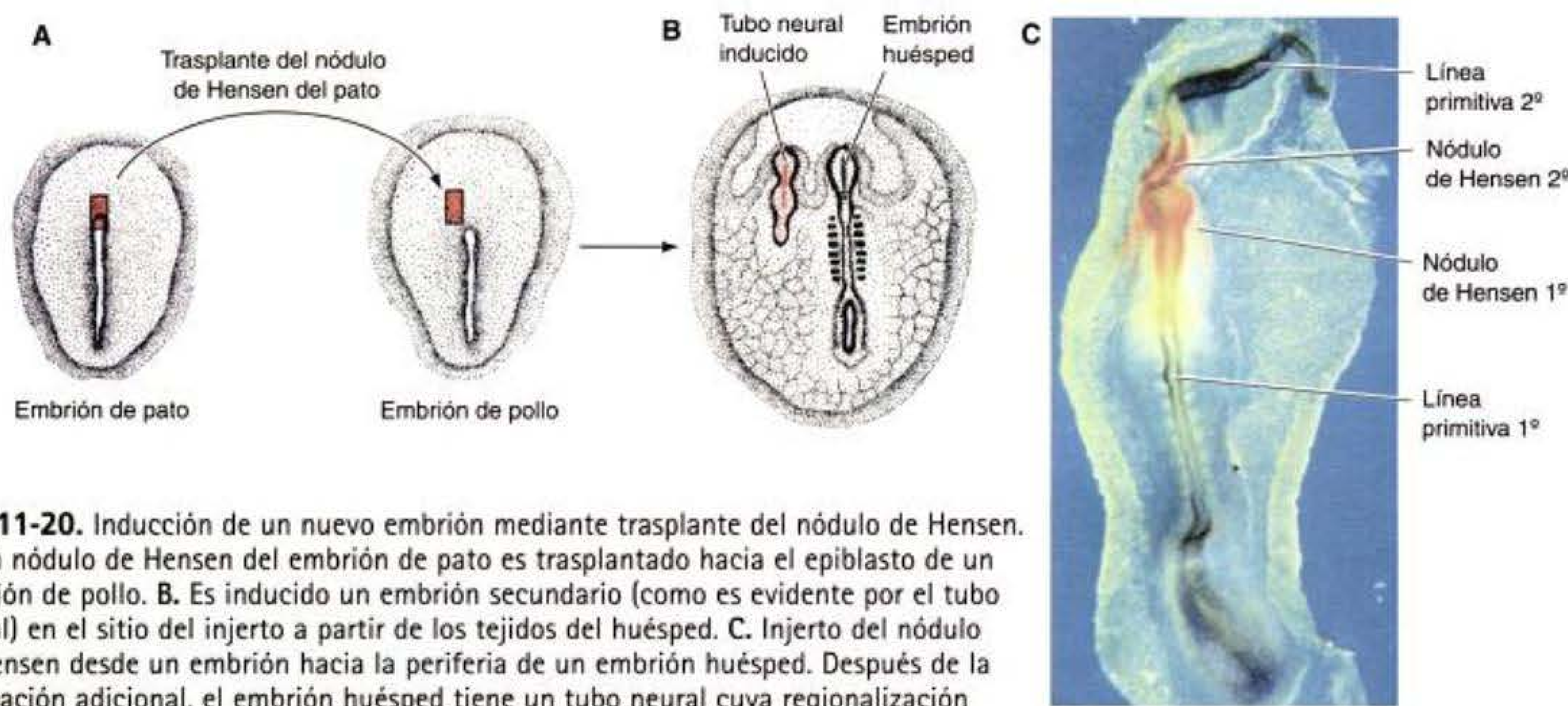


Fig. 11-20. Inducción de un nuevo embrión mediante trasplante del nódulo de Hensen. **A.** Un nódulo de Hensen del embrión de pato es trasplantado hacia el epiblasto de un embrión de pollo. **B.** Es inducido un embrión secundario (como es evidente por el tubo neural) en el sitio del injerto a partir de los tejidos del huésped. **C.** Injerto del nódulo de Hensen desde un embrión hacia la periferia de un embrión huésped. Después de la incubación adicional, el embrión huésped tiene un tubo neural cuya regionalización puede observarse mediante hibridación in situ. Las sondas para *otx2* (rojo) reconocen la región de la cabeza, mientras que las sondas para *hoxb1* (azul) reconocen el tubo neural del tronco. El nódulo donante ha inducido la formación de un eje secundario completo con regiones de la cabeza y del tronco. (A, B, según Waddington 1933; C, de Boettger y col. 2001.)

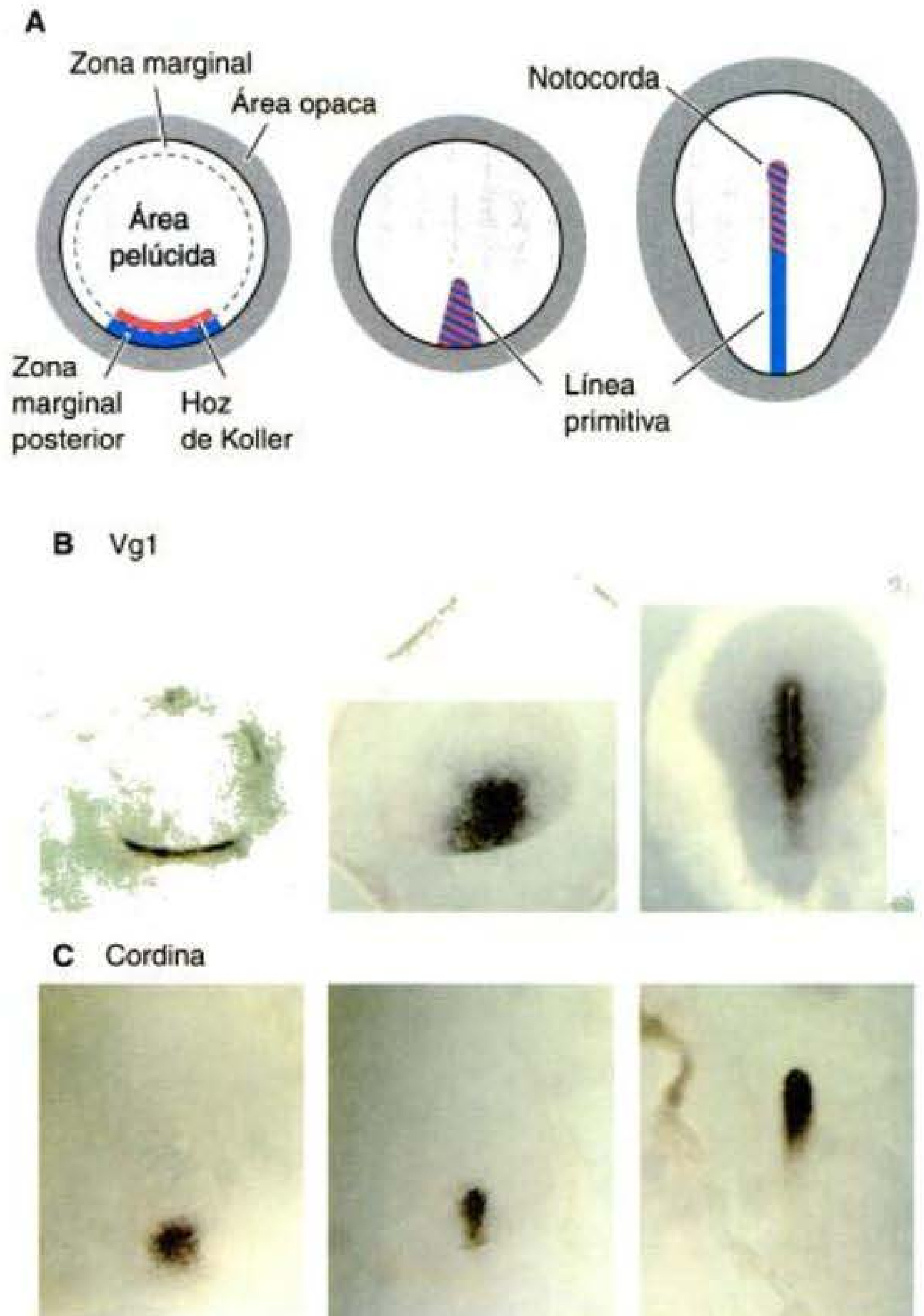


Fig. 11-21. Expresión génica en la línea primitiva. **A.** Esquema de dos patrones de expresión génicos generales. El epiblasto temprano del pollo (panel de la izquierda) muestra el área opaca, el área pelúcida, la zona marginal, la hoz de Koller (rojo) y la zona marginal posterior (azul). En un estadio un poco más tarde (panel del medio), las células expresan los genes del centro de Nieuwkoop y los genes del organizador extendiéndose hacia la línea primitiva. En estadios tardíos (panel de la derecha) los genes del centro de Nieuwkoop son expresados a lo largo de la línea primitiva, mientras que los genes del organizador son expresados en la región más anterior. **B.** Expresión de la proteína Vg1 a medida que se forma la línea primitiva. (A, según Boettger y col. 2001; B, C, según Lawson y col. 2001, microfotografías cortesía de G. Schoenwolf.)

Formación del eje izquierda-derecha

Como se ha visto, el cuerpo de los vertebrados no es simétrico. En su lugar, tiene lados derecho e izquierdo diferentes. El corazón y el bazo, por ejemplo, están en general sobre el lado izquierdo del cuerpo, mientras que el hígado está con frecuencia sobre el lado derecho. La distinción entre los lados derecho e izquierdo de vertebrados está regulada por dos proteínas principales: el factor paracrino **Nodal** y el factor de transcripción **Pitx2**. Sin embargo, el mecanismo por el cual la expresión del gen *nodal* es activada en el lado izquierdo del cuerpo di-

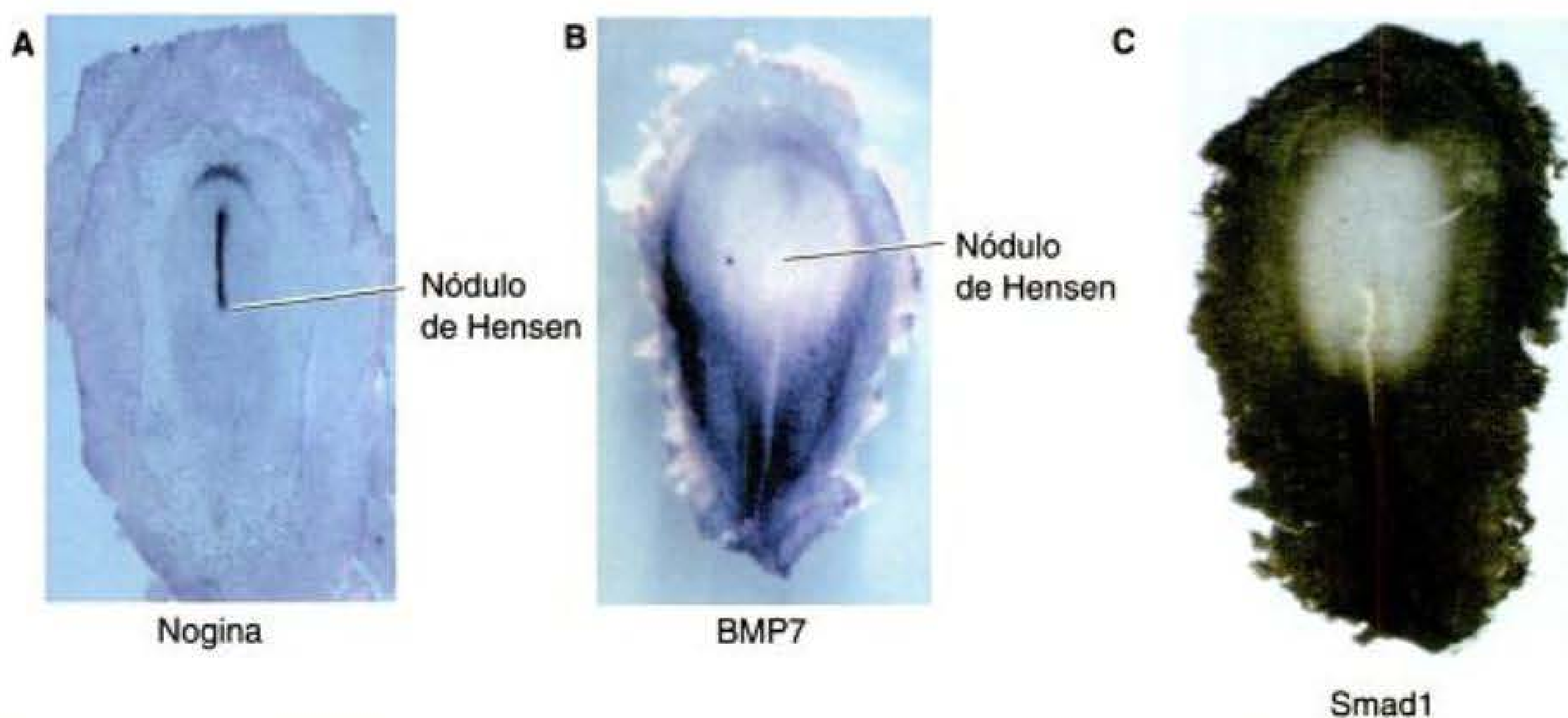
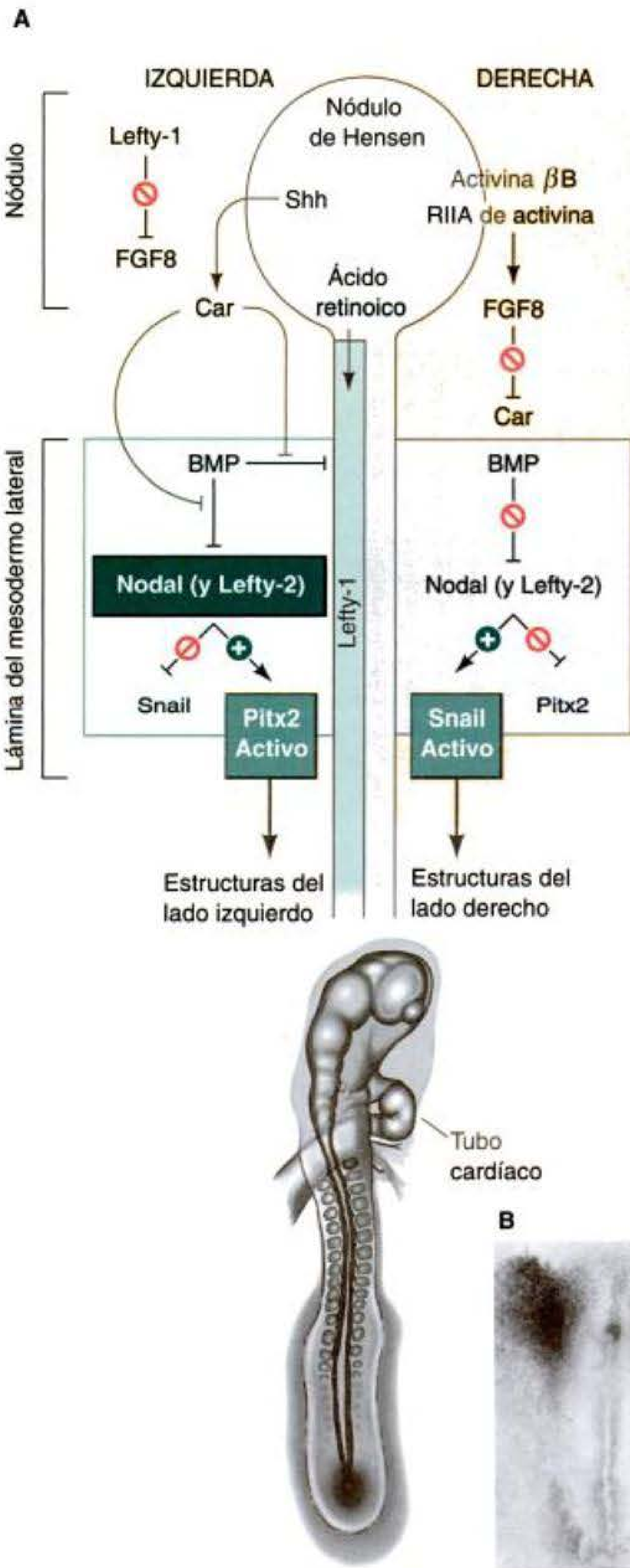


Fig. 11-22. Posible contribución a la inducción neural del pollo mediante la inhibición de la señal de BMP. **A.** En un embrión en neuralización, la proteína Nogina (violeta oscuro) es expresada en el nódulo de Hensen, la notocorda y el endodermo faríngeo. **B.** La expresión de *Bmp7* (violeta oscuro), que ha abarcado a la totalidad del epiblasto, se vuelve restringida a las regiones no neurales del ectodermo. **C.** Del mismo modo, el producto de la señal de BMP, la forma fosforilada de Smad1 (reconocida por anticuerpos contra la forma fosforilada de la proteína, marrón oscuro) no es observada en la placa neural. (Según Faure y col. 2002; microfotografías cortesía de los autores.)

fiere entre las clases de vertebrados. La facilidad con la que pueden ser manipulados los embriones de pollo ha permitido a los científicos esclarecer las vías de determinación izquierda-derecha más fácilmente en aves que en otros vertebrados.

A medida que la línea primitiva alcanza su máxima longitud, el factor de transcripción del gen *sonic hedgehog* deja de producirse sobre el lado derecho del embrión, debido a la expresión sobre este lado de activina y de su receptor (fig. 11-23). La señal de activina bloquea la expresión de *sonic hedgehog* y activa la expresión de *fgf8*. FGF8 evita la transcripción del gen *caronte*. Ante la ausencia de Caronte, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son capaces de bloquear la expresión de *nodal* y de *lefty-2*. Esto permite la expresión del gen *snail*, que es característico del lado derecho de los órganos embrionarios de las aves. Sobre el lado izquierdo del cuerpo, la proteína Lefty-1 bloquea la expresión de *fgf8*, mientras que *Sonic hedgehog* activa a *caronte* (fig. 11-24). **Caronte** es un factor paracrino que evita que las BMPs repriman a los genes *nodal* y *lefty-2* y también impide que las BMP bloqueen la expresión de *lefty-1* sobre las estructuras de la línea media ventral (Rodríguez-Esteban y col. 1999; Yokouchi y col. 1999). Nodal y Lefty-2 activan a



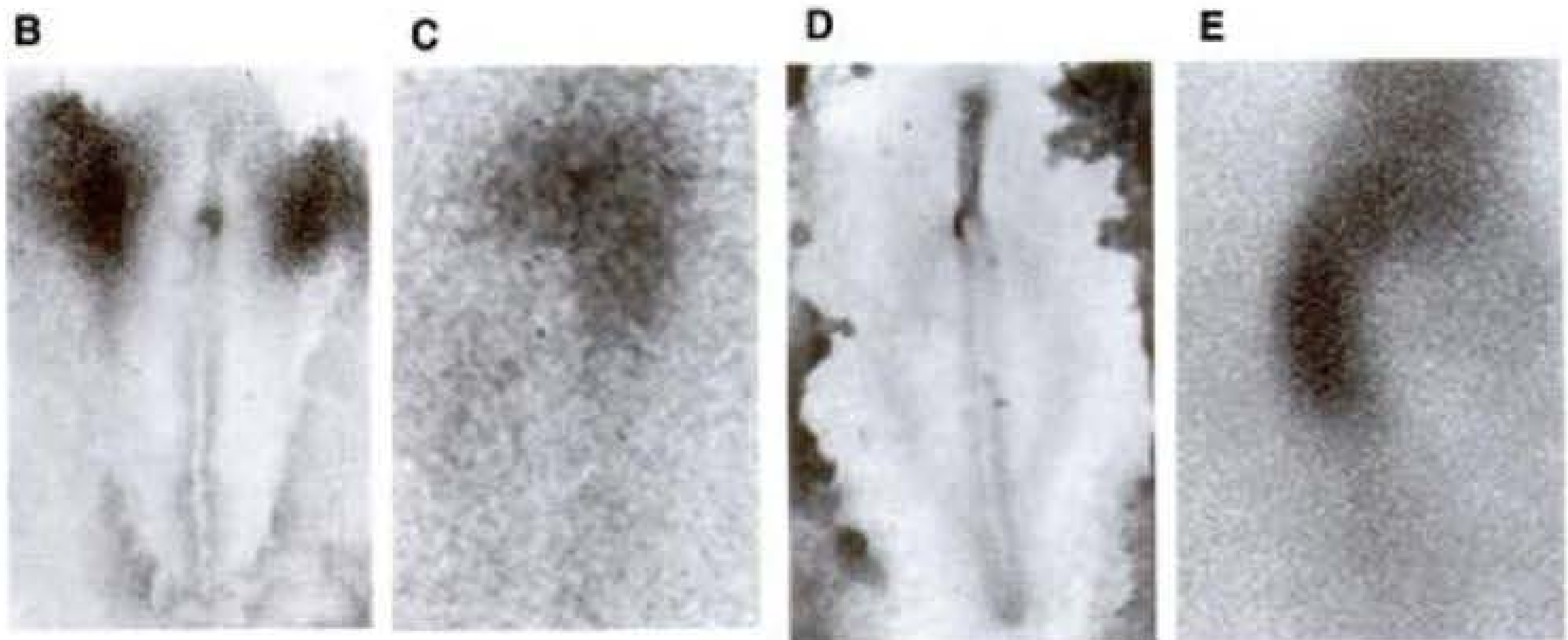


Fig. 11-23. Vía o ruta para la asimetría izquierda-derecha en el embrión de pollo. **A.** Lado izquierdo: sobre el lado izquierdo del nódulo de Hensen, se expresan *sonic hedgehog* (*shh*) y *lefty-1*. La proteína Lefty-1 bloquea la expresión de *fgf8*, mientras que Sonic hedgehog activa la expresión de *caronte* (*car*). Mientras tanto, el ácido retinoico permite la expresión de *lefty-1* a lo largo de la línea media ventral. La proteína caronte bloquea la expresión de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) sobre el lado izquierdo, que de otro modo podrían bloquear la expresión de *nodal* y *lefty-2*. Ante la presencia de Nodal y de Lefty-2, el gen *pitx2* es activado y el gen *snail* (*cSnR*) es reprimido. Pitx2 es activo en varios primordios de órganos y especifica el lado para ser izquierdo. En el lado derecho del embrión, es expresada activina, junto con el receptor IIa de activina. Esto activa a FGF8, una proteína que bloquea la expresión de *caronte*. Ante la ausencia de la proteína Caronte, BMP reprime la activación de *nodal* y de *lefty 2*. Esto permite al gen *snail* ser activo mientras que el gen *pitx2* se mantiene reprimido. **B, C.** Vistas dorsal y de cerca de la hibridación in situ del mRNA de *sonic hedgehog*. **D, E.** Vistas dorsal y de cerca del mensajero del receptor IIa de activina. (**A**, según Rodríguez-Esteban y col. 1999; **B–E**, de Levin y col. 1995, microfotografías cortesía de C. Tabin y C. Stern.)



Fig. 11-24. La transmisión de la señal del lado izquierdo del nódulo de Hensen hacia la lámina del mesodermo lateral resulta de la expresión asimétrica de los genes *caronte*, *nodal* y *pitx2* en el lado izquierdo del embrión de pollo. **A.** Hibridación in situ de un embrión montado entero o in toto (*whole mount*) del mRNA de *caronte*. Esta vista es de la superficie ventral "desde abajo" de modo que la expresión parece ser sobre la derecha. Dorsalmente, el patrón de expresión estaría sobre la izquierda. **B.** La hibridación in situ in toto con el uso de sondas para el mensajero *nodal* del pollo (teñida de púrpura) muestra su expresión en la lámina del mesodermo lateral solo sobre el lado izquierdo del embrión. Esta vista es del lado dorsal (mira el embrión "hacia abajo"). **C.** Hibridación in situ similar, con el uso de la sonda de pitx2 en un estadio de desarrollo más tardío. El embrión es visto desde su superficie ventral. En este estadio se está formando el corazón y la expresión de pitx2 puede verse sobre el lado izquierdo del tubo cardiaco (así como simétricamente en los tejidos más anteriores). (**A**, de Rodríguez-Esteban y col. 1999, microfotografía cortesía de J. Izpisúa-Belmonte; **B**, microfotografía cortesía de C. Stern; **C**, de Logan y col. 1998, microfotografía cortesía de C. Tabin.)

pitx2 y reprimen a *snail*. Lefty-1 en la línea media ventral evita que la señal de Caronte pase hacia el lado derecho del embrión. Como en *Xenopus*, Pitx2 es decisivo para dirigir la asimetría de las estructuras embrionarias. La expresión inducida experimentalmente de *nodal* o de *pitx2* sobre el lado derecho del pollo es capaz de invertir la asimetría o de causar una asimetría al azar sobre los lados derecho o izquierdo* (Logan y col. 1998; Ryan y col. 1998).

El curso hacia el lado derecho o el izquierdo puede ser interferido en cualquier punto de esta vía. Si la activina es bloqueada por el agregado experimental de folistatina al embrión, desaparece la asimetría de expresión de Sonic hedgehog y la orientación del asa cardíaca tendrá las mismas posibilidades para cada lado (Levin y col. 1995, 1997). Por el contrario, cuando se colocan sobre el lado izquierdo del nódulo de Hensen bolitas embebidas en activina, el gen *sonic hedgehog* (expresado en general sólo sobre el lado izquierdo) es reprimido. Esto, a su vez, suprime la transcripción de *nodal*. En esta situación, el tubo cardíaco también se forma al azar: tiene iguales probabilidades de estar a la izquierda o a la derecha. Se puede producir una condición semejante mediante la implantación de células que secretan Sonic hedgehog hacia el lado derecho del nodo. En estos casos, nodal es inducido simétricamente en la placa del mesodermo lateral y el corazón tiene un 50% de posibilidades de localizarse sobre el lado izquierdo (fig. 11-25).

* En los seres humanos, la carencia homocigota de *PITX2* causa el síndrome de Rieger, un trastorno caracterizado por anomalías de asimetría. Un trastorno similar es causado por el knockout de este gen en los ratones (Fu y col. 1999; Lin y col. 1999).

DESARROLLO TEMPRANO EN LOS MAMÍFEROS

Segmentación en los mamíferos

No es sorprendente que la segmentación en los mamíferos haya sido la más difícil de estudiar. Los cigotos de los mamíferos están entre los más pequeños del reino animal

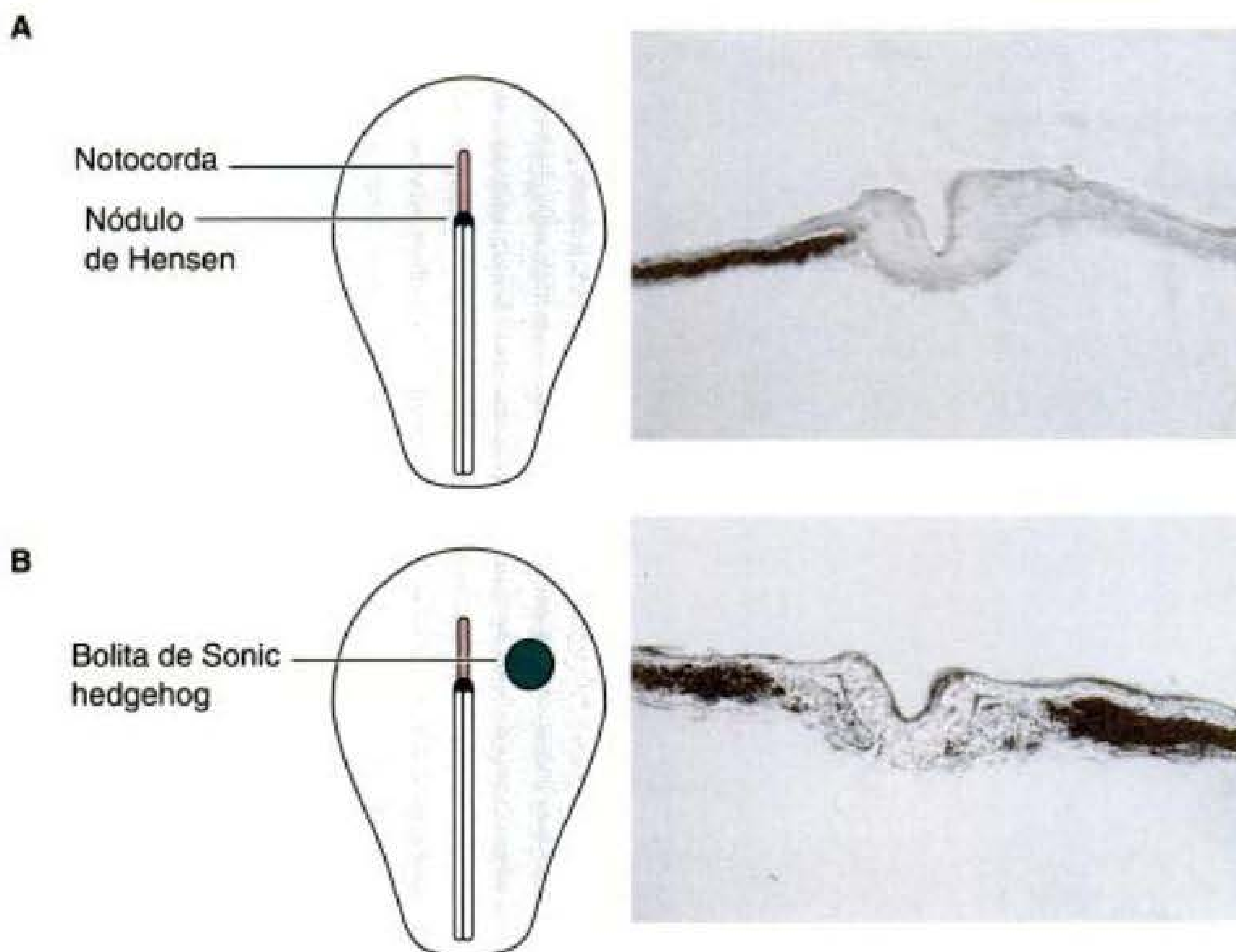


Fig. 11-25. La expresión ectópica de *sonic hedgehog* lleva a la expresión simétrica de *nodal* y al posicionamiento al azar del asa cardíaca. **A.** Expresión tipo salvaje del gen *nodal* de pollo, que muestra expresión sobre el lado izquierdo (área oscura). Casi todos los corazones desarrollan asas sobre el lado derecho. Este patrón se ve también cuando se colocan bolitas que contienen sustancias control que son implantadas sobre el lado derecho del nódulo de Hensen, o cuando una bolita que contiene Sonic hedgehog es implantada sobre el lado izquierdo (donde *sonic hedgehog* es expresado frecuentemente). **B.** Cuando una bolita de Sonic hedgehog es implantada sobre el lado derecho del nódulo, la expresión de *nodal* se vuelve bilateralmente simétrica y el corazón puede estar en cualquier lado. (De Levin y col. 1995; microfotografías cortesía de los autores.)

y son difíciles de manipular experimentalmente. El cigoto humano, por ejemplo, tiene solo 100 μm de diámetro; apenas visible al ojo y menos de una milésima del volumen del huevo (cigoto) de *Xenopus*. Además, los cigotos de mamíferos no son producidos en números comparables con los cigotos del erizo de mar o a los de la rana, por lo que es muy difícil obtener material suficiente para estudios bioquímicos. Con frecuencia, menos de 10 ovocitos son ovulados por una hembra en un determinado momento. Como un obstáculo final, el desarrollo de los embriones de mamíferos es llevado a cabo dentro de otro organismo, en lugar de un ambiente externo. Solo recientemente ha sido posible reproducir algunas de estas condiciones internas y observar el desarrollo de mamíferos in vitro.

La naturaleza única de la segmentación en los mamíferos

Con todas estas dificultades, se justificó la demora en el conocimiento sobre la segmentación en los mamíferos debido a que esta segmentación ha resultado ser sorprendentemente diferente de la mayoría de los otros patrones de división celular embrionaria. El ovocito de los mamíferos es liberado desde el ovario y barrido por las fimbrias hacia la trompa de Falopio (fig. 11-26). La fecundación se produce en la ampolla de la trompa de Falopio (oviducto), una región próxima al ovario. En este momento se completa la meiosis y la primera segmentación comienza cerca de un día más tarde (véase fig. 7-32). Las segmentaciones en los cigotos de mamíferos están entre

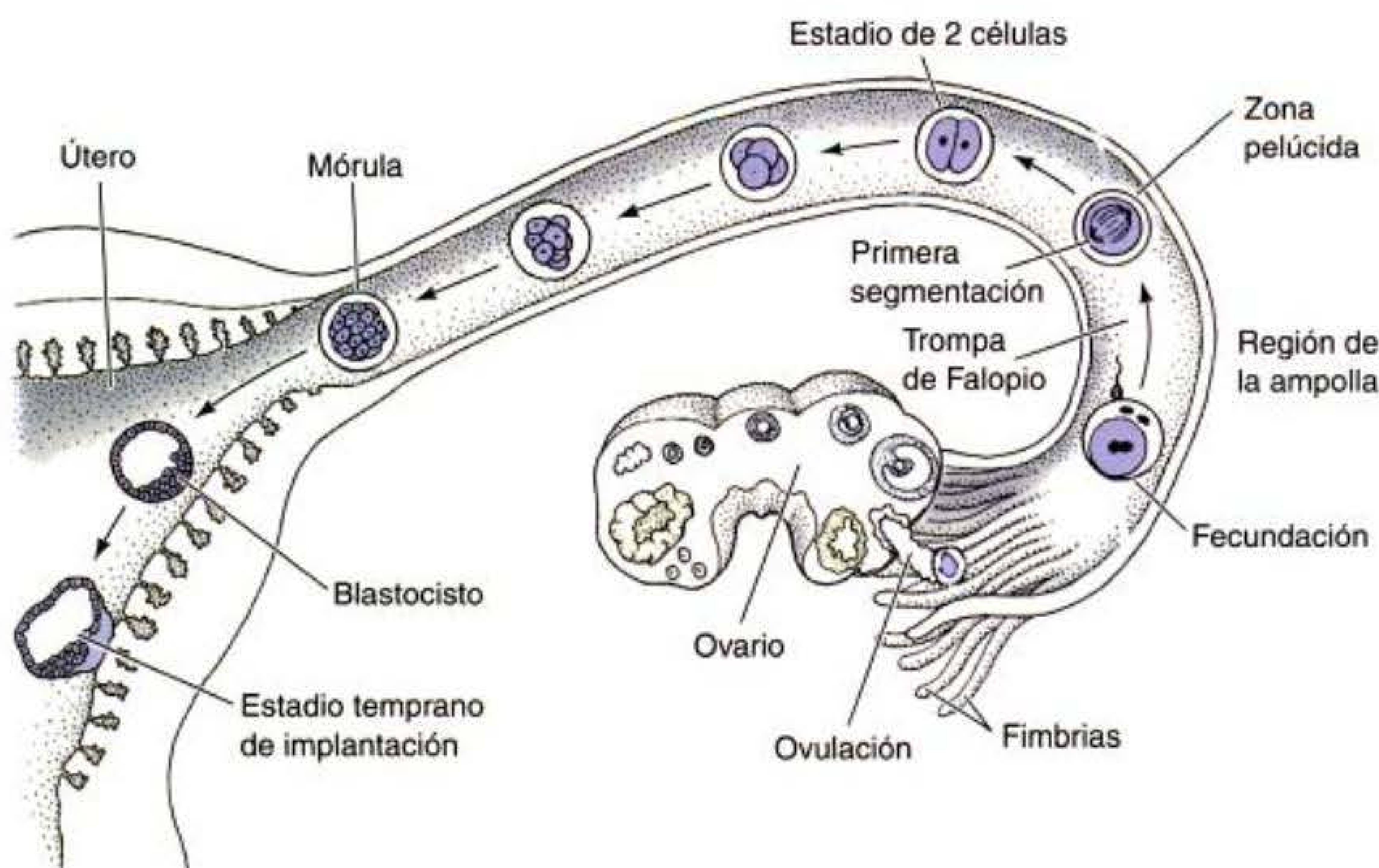


Fig. 11-26. Desarrollo del embrión humano desde la fecundación a la implantación. La compactación del embrión humano se produce sobre el día 4, cuando se encuentra en el estadio de 10 células. El embrión "eclosiona" desde la zona pelúcida al llegar al útero. Durante su migración hacia el útero, la zona evita que el embrión se adhiera prematuramente al oviducto en lugar de viajar hacia el útero. (Según Tuchmann-Duplessis y col. 1972.)

las más lentas en el reino animal; cerca de 12-24 horas de separación. Mientras tanto, los cilios en la trompa de Falopio empujan al embrión hacia el útero; la primera segmentación se produce durante este viaje.

Además de este enlentecimiento de la división celular, otras características de la segmentación de los mamíferos la distinguen de los otros tipos de segmentación. La segunda de estas diferencias es la orientación única que tienen entre sí las blastómeras de los mamíferos. La primera segmentación es una división meridional normal; sin embargo, en la segunda segmentación, una de las dos blastómeras se divide meridionalmente y la otra se divide ecuatorialmente (fig. 11-27). Este tipo de segmentación es denominada **segmentación rotacional** (Gulyas 1975).

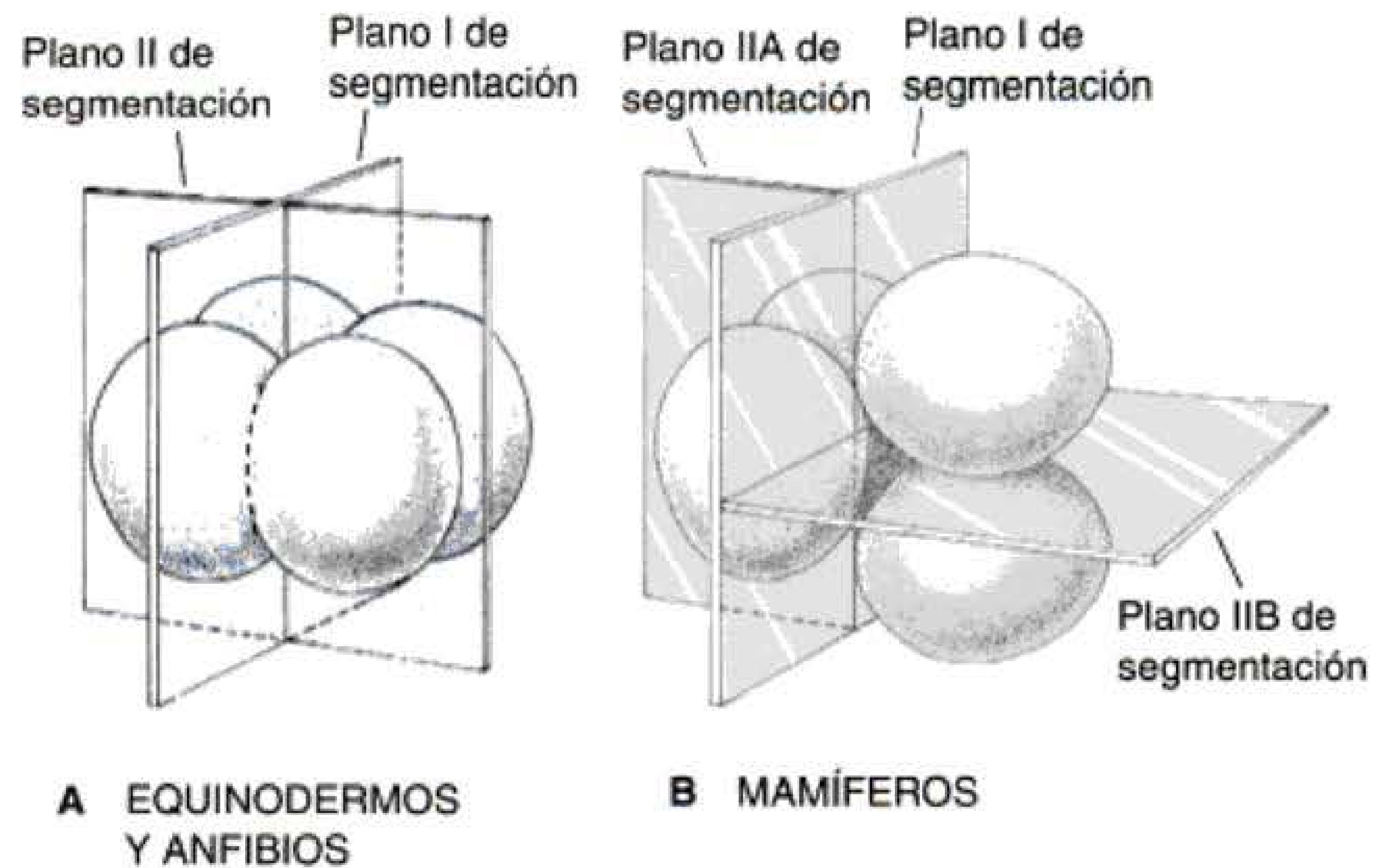


Fig. 11-27. Comparación de la segmentación temprana en **A**, equinodermos y anfibios (segmentación radial) y **B**, mamíferos (segmentación rotacional). Los nematodos tienen también una forma rotacional de segmentación, pero no forman la estructura del blastocisto característica de los mamíferos. (Según Gulyas 1975.)

La tercera diferencia principal entre la segmentación en los mamíferos y la de la mayoría de los otros embriones es la marcada asincronía de la división celular temprana. Las blastómeras de los mamíferos no se dividen todas al mismo tiempo. Por lo tanto, los embriones no aumentan exponencialmente desde los estadios de 2 a 4, a 8 células, sino que contienen números impares de células. La cuarta, a diferencia de la mayoría de los otros genomas animales, el genoma de mamíferos es activado durante la segmentación temprana y produce las proteínas necesarias para que se produzcan la segmentación y el desarrollo. En el ratón y en la cabra, el cambio desde el control materno al cigótico se produce en el estadio de 2 células (Piko y Clegg 1982; Prather 1989).

La mayor parte de la investigación sobre el desarrollo de los mamíferos está centrada en el ratón, ya que los ratones son relativamente fáciles de criar durante el año, tienen grandes camadas y pueden ser fácilmente albergables. Por lo tanto, la mayoría de los estudios aquí detallados se ocupan del desarrollo murino (ratón).

Compactación

La quinta y tal vez la diferencia más decisiva entre la segmentación en los mamíferos y la de otros tipos involucra el fenómeno de la **compactación.** Como se observa en la figura 11-28, las blastómeras de ratón durante el estadio de 8 células forman una organización laxa con abundante espacio entre sí. Sin embargo, después de la tercera segmentación las blastómeras experimentan un cambio espectacular en su conducta. Proteínas de adhesión celular como la cadherina-E comienzan a expresarse y las blastómeras repentinamente se agrupan y forman una esfera compacta de células (figs. 11-28C, D y 11-29; Peyrieras y col. 1983; Fleming y col. 2001). Esta organización firmemente empaquetada es estabilizada por las uniones estrechas que se forman entre las células exteriores de la esfera que sellan el interior de la esfera. Las células dentro de la esfera forman uniones nexo, permitiendo de este modo el paso entre ellas de pequeñas moléculas e iones.

Las células del embrión de 8 células compactado se dividen para producir una **mórula** de 16 células (fig. 11-28E). La mórula consiste en un pequeño grupo de células internas rodeadas por un grupo más grande de células externas (Barlow y col. 1972). La mayoría de los descendientes de las células externas se convierten en las células del

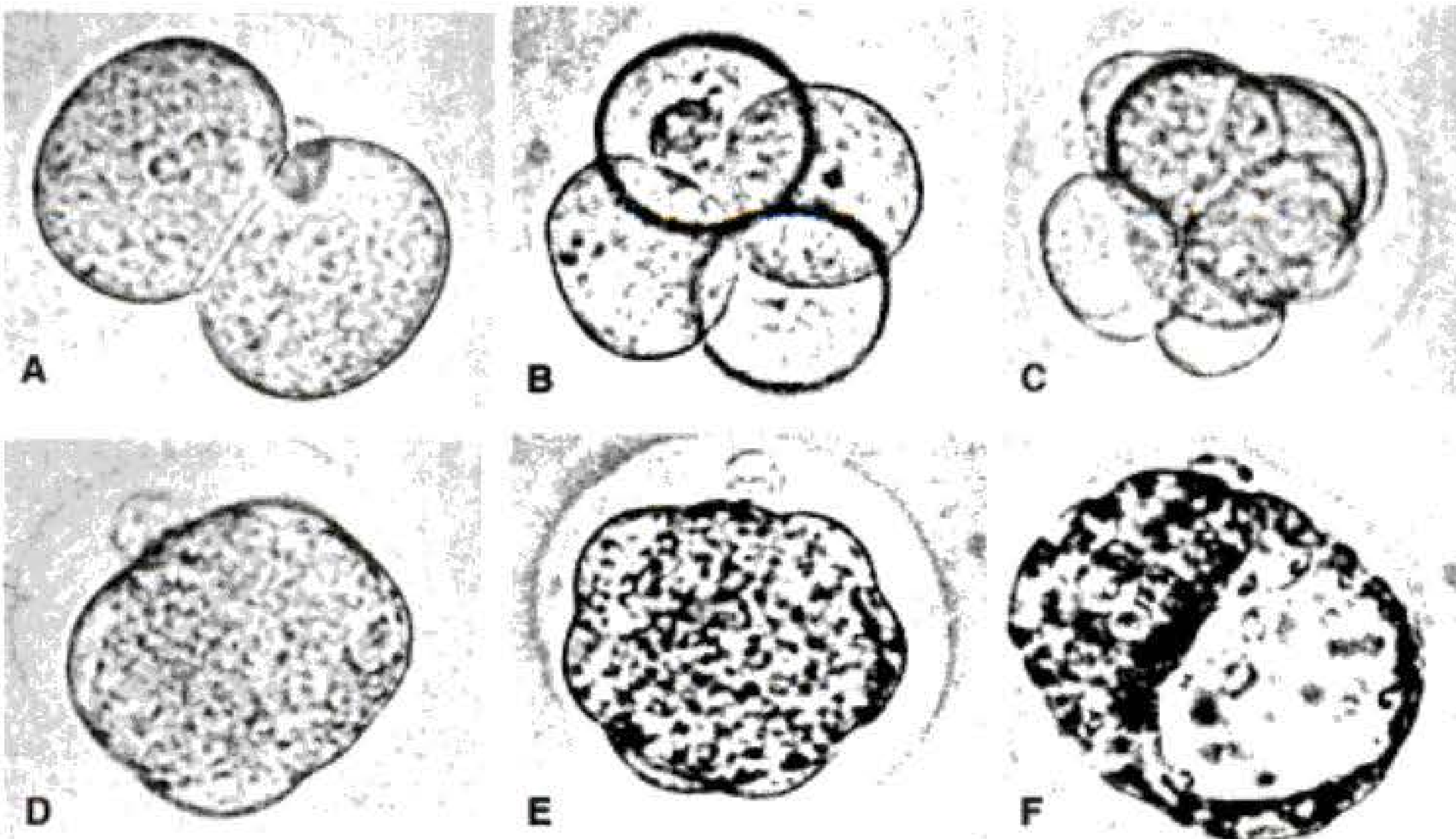


Fig. 11-28. Segmentación de un único embrión de ratón in vitro. **A.** Estadio de 2 células. **B.** Estadio de 4 células. **C.** Estadio temprano de 8 células. **D.** Estadio compactado de 8 células. **E.** Mórula. **F.** Blastocisto. (De Mulnard 1967; microfotografías de J. G. Mulnard.)

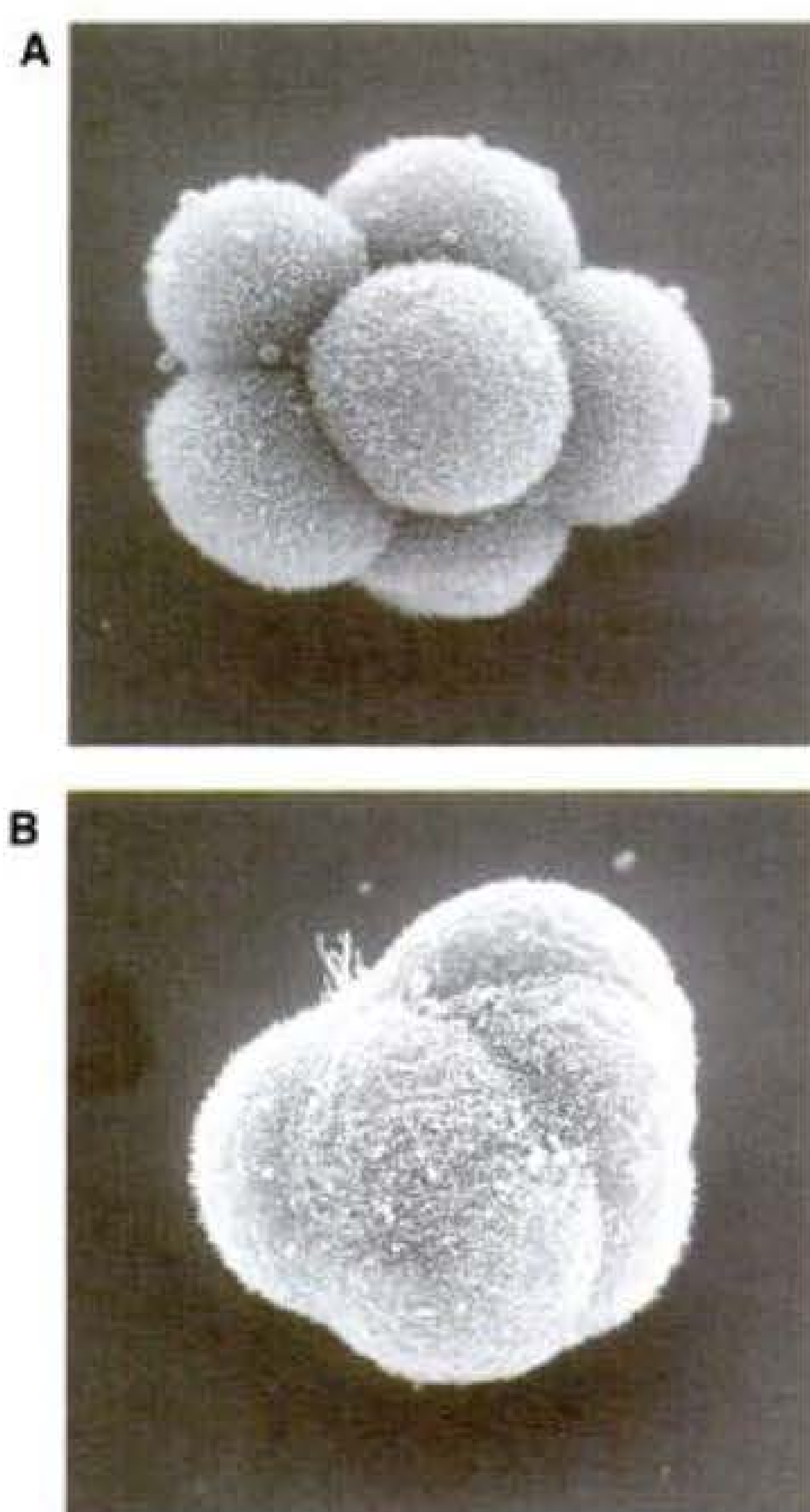


Fig. 11-29. Microfotografías electrónicas de barrido de embriones de ratón de 8 células, A, sin compactar y B, compactado. (Microfotografías cortesía de C. Ziomek.)

trofoblasto (**trofoectodermo**). Este grupo de células no produce estructuras embrionarias. En su lugar, éste forma el tejido del **corion**, la porción embrionaria de la **placenta**. El corion le permite al feto obtener oxígeno y nutrientes desde la madre. Además, secreta hormonas que hacen que el útero de la madre retenga al feto y produce factores reguladores de la respuesta inmune de modo tal que la madre no rechazará al embrión, que sí lo haría con un órgano injertado.

El embrión de ratón verdadero es derivado de descendientes de las células internas del estadio de 16 células, complementado por células que se dividen desde el trofoblasto durante la transición hacia el estadio de 32 células (Pedersen y col. 1986; Fleming 1987). Estas células generan la **masa celular interna** (**MCI**), que dará origen al embrión y a su saco vitelino, su alantoides y su amnios asociados. Hacia el estadio de 64 células, la masa celular interna (de 13 células aproximadamente) y las células del trofoblasto han llegado a constituir capas celulares separadas, sin células que contribuyan al otro grupo (Dyce y col. 1987; Fleming 1987). Por lo tanto, la distinción entre las blastómeras del trofoblasto y las de la masa celular interna representa el primer acontecimiento de diferenciación en el desarrollo de mamíferos. Esta diferenciación es requerida para que el embrión temprano de mamífero se adhiera al útero; el desarrollo del embrión verdadero puede esperar hasta después de producida la adhesión. La masa celular interna mantiene activamente al trofoblasto, secretando proteínas (como FGF4) que hacen que las células del trofoblasto se dividan (Tanaka y col. 1998). Una vez que es tomada la decisión de convertirse en trofoblasto o en masa celular interna, las células de estas dos regiones expresan diferentes genes. La masa celular interna retiene la expresión de **Oct4 y Foxd3**, dos factores de transcripción asociados con la **pluripotencialidad**, la capacidad para formar todos los tipos celulares del cuerpo. Las células del trofoblasto sintetizan el factor de transcripción **eomesodermin**, que activa a aquellas proteínas características de la capa trofoblástica (Russ y col. 2000; Hanna y col. 2002).

Inicialmente, la mórula no tiene una cavidad interna. Sin embargo, durante un proceso denominado **cavitación**, las células del trofoblasto secretan un fluido hacia la mórula para crear un blastocele. Las membranas de las células del trofoblasto contienen una bomba de sodio (una Na^+/K^+-ATPasa) que reviste el blastocele y esta proteína de transmembrana bombea iones de sodio hacia la cavidad central. La acumulación subsiguiente de iones de sodio atrae agua osmóticamente, y amplía de este modo el blastocele (Borland 1977; Wiley 1984). La masa celular interna está posicionada sobre uno de los lados del anillo de células trofoblásticas (véase fig. 11-28F). El tipo de blástula resultante, denominada **blastocisto**, es otra característica distintiva de la segmentación de mamíferos.

SITIO WEB 11.3 **Mecanismos de compactación y de formación de la masa celular interna (Mechanisms of compaction and the formation of the inner cell mass).** ¿Qué determina si una célula se convierte en célula trofoblástica o en un miembro de la masa celular interna? Puede solo ser una cuestión de oportunidades. Sin embargo, una vez que la decisión es tomada, diferentes genes son encendidos.

SITIO WEB 11.4 **Segmentación y compactación humana (Human cleavaje and compaction).** Las blastómeras XY tienen una ventaja leve de crecimiento que puede ejercer profundos efectos sobre las intervenciones de fecundación in vitro.

Fuga desde la zona pelúcida

Mientras el embrión se está moviendo a través la trompa de Falopio (u oviducto) hacia el útero, el blastocisto se expande dentro de la **zona pelúcida** (la matriz extracelular del ovocito que era esencial para la unión del espermatozoide durante la fecundación; véase cap. 7). Durante este tiempo, la zona pelúcida evita que el blastocisto se adhiera a las paredes de la trompa de Falopio. Cuando tales adherencias tienen lugar en seres humanos, se produce un **embarazo ectópico ("tubario")**. Esta condición es grave debido a que la implantación del embrión en la trompa de Falopio puede causar una hemorragia peligrosa para la vida. Sin embargo, cuando el embrión alcanza el útero debe "eclosionar" desde la zona de modo tal que pueda adherirse a la pared uterina.

El blastocisto de ratón eclosiona desde la zona mediante la lisis de un orificio en ésta y metiéndose por el agujero a medida que el blastocisto se expande (fig. 11-30A). La **estripsina**, una proteasa parecida a la tripsina que se encuentra sobre la membrana celular del trofoblasto, lisa un agujero en la matriz fibrilar de la zona (Perona y Was-

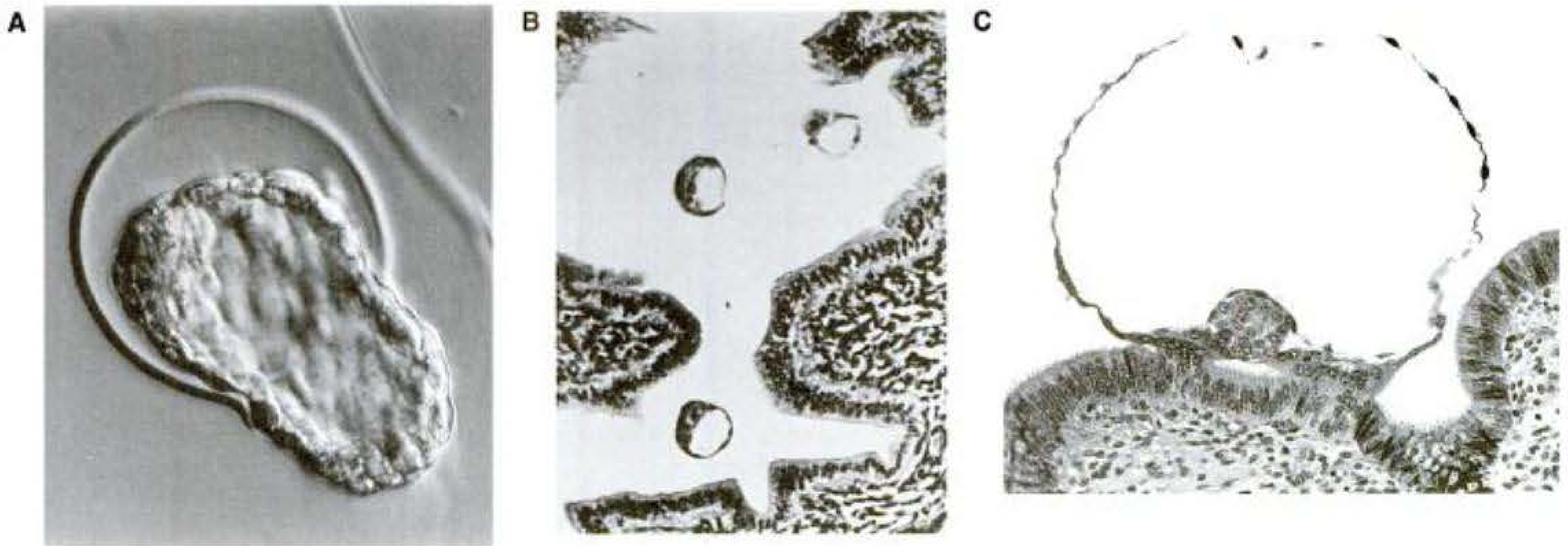


Fig. 11-30. Eclosión del blastocisto de mamífero desde la zona pelúcida e implantación en el útero. **A.** Blastocisto de ratón cuando eclosiona desde la zona pelúcida. **B.** Blastocisto de ratón cuando entra en el útero. **C.** Implantación inicial del blastocisto en el mono rhesus. (A, de Mark y col. 1985, microfotografía cortesía de E. Lacy; B, de Rugh 1967; C, microfotografía cortesía de la Carnegie Institution of Washington, Chester Reather, fotógrafo.)

sarman 1986; Yamazaki y Kato 1989; O'Sullivan y col. 2001). Una vez fuera de la zona, el blastocisto puede hacer contacto directo con el útero. El epitelio uterino (**endometrio**) "atrapa" al blastocisto sobre la matriz extracelular que contiene colágeno, laminina, fibronectina, ácido hialurónico y receptores de heparán sulfato. Las células del trofoblasto contienen integrinas que se unen al colágeno uterino, a la fibronectina y a la laminina, y sintetizan el proteoglucano heparan sulfato precisamente previo a la implantación (véase Carson y col. 1993). Una vez en contacto con el endometrio, el trofoblasto secreta otro grupo de proteasas, incluidas colagenasa, estromelisina y activador del plasminógeno. Estas enzimas digieren las proteínas de la matriz extracelular del tejido uterino, permitiéndole al blastocisto autosepultarse dentro de la pared uterina (Strickland y col. 1976; Brenner y col. 1989).

SITIO WEB 11.5 **Los mecanismos de la implantación (The mechanisms of compaction).** Los mecanismos moleculares por medio de los cuales el blastocisto se adhiere e ingresa en la pared uterina constituyen una historia fascinante de adhesión celular y de interacciones recíprocas entre dos organismos, la madre y el embrión.

Gastrulación en los mamíferos

Las aves y los mamíferos son descendientes de especies de reptiles. Por lo tanto, no sorprende que el desarrollo de mamíferos sea análogo al de reptiles y aves. Lo que *es* sorprendente es que los movimientos de la gastrulación de los embriones de reptiles y de aves, que evolucionaron como una adaptación de los huevos vitelínicos, se han conservado en los embriones de mamífero aún ante la ausencia de grandes cantidades de vitelo. La masa celular interna de los mamíferos puede imaginarse como estando encima de una esfera imaginaria de vitelo, siguiendo las instrucciones que parecen más apropiadas a sus antepasados reptiles.

Modificaciones para el desarrollo dentro de otro organismo

El embrión de mamífero obtiene nutrientes directamente desde su madre y no depende de vitelo almacenado. Esta adaptación ha supuesto una reestructuración espectacular de la anatomía materna (como la expansión de la trompa de Falopio para formar el útero) además del desarrollo de un órgano fetal capaz de absorber nutrientes maternos. Este órgano fetal –el corion– es derivado primariamente de las células trofoblásticas embrionarias, complementado con células mesodérmicas derivadas de la masa celular interna. El corion forma la porción fetal de la placenta. Esto también induce a las células uterinas a formar la porción materna de la placenta, la **decidua**. La decidua llega a ser rica en vasos sanguíneos que proporcionarán oxígeno y nutrientes al embrión.

Los orígenes de los tejidos tempranos de mamíferos se resumen en la figura 11-31. La primera segregación de células dentro de la masa celular interna forma dos capas: la capa más inferior, el **hipoblasto** (a veces denominado **endodermo primitivo**), y el tejido de masa celular interna restante por arriba de éste, el **epiblasto** (fig. 11-32A). El epiblasto y el hipoblasto forman una estructura denominada **disco germinativo bilaminar**. Las células del hipoblasto se extienden desde la masa celular interna para revestir la cavidad del blastocele*, donde dan origen al **endodermo extraembrionario**, que forma el saco vitelino. Como en los embriones de aves, estas células no producen ninguna parte del organismo del recién nacido. La capa celular del epiblasto se separa mediante pequeñas hendiduras que finalmente se unen para separar al **epi-**

* *Nota del traductor:* algunos autores consideran más apropiado denominar a esta cavidad como cavidad del blastocisto debido a que presenta diferencias con respecto al blastocele de los anfibios.

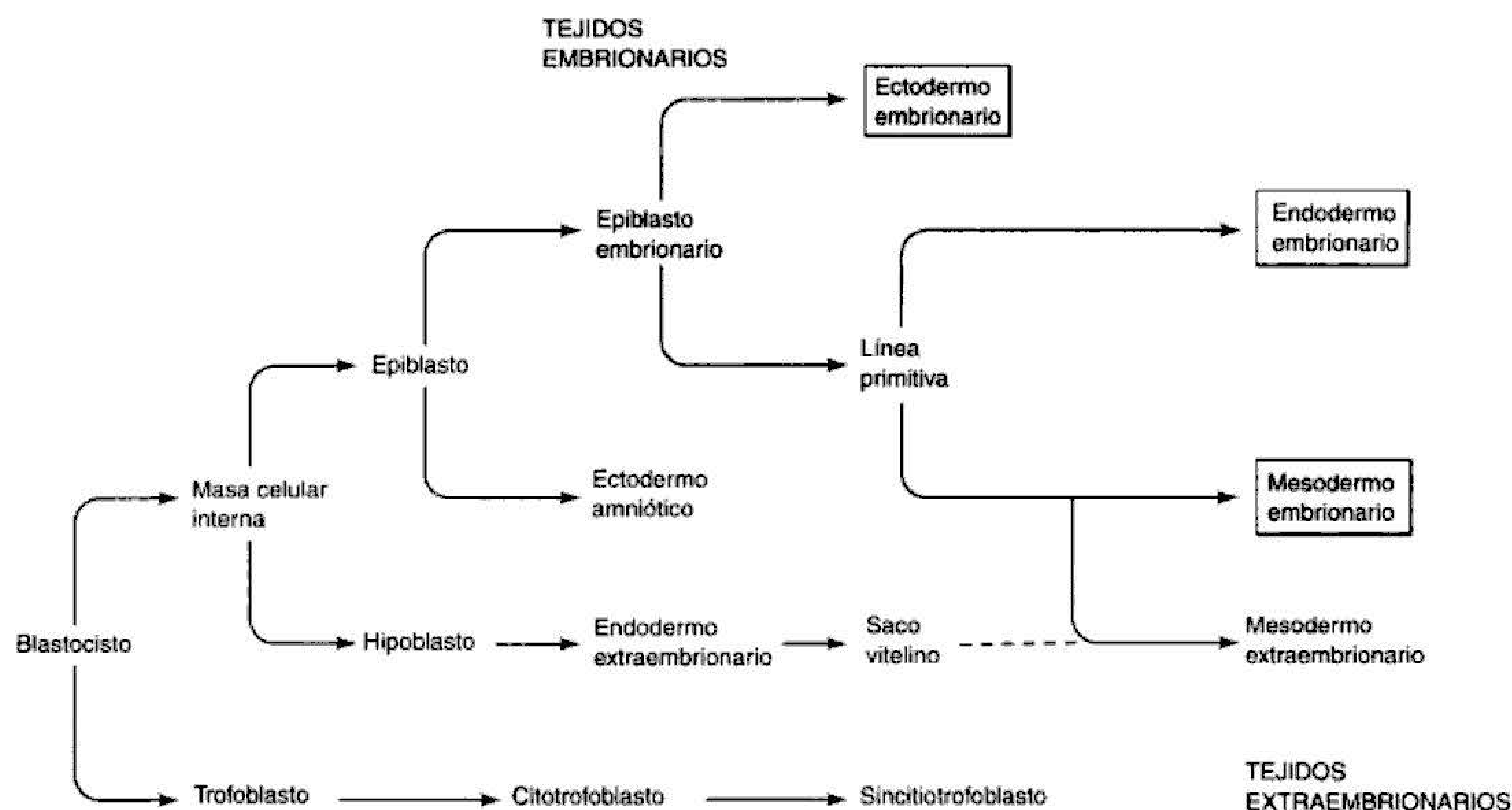


Fig. 11-31. Diagrama esquemático que muestra los derivados de los tejidos en los embriones humanos y de mono rhesus. La línea entrecortada indica un posible origen doble del mesodermo extraembrionario. (Según Luckett 1978; Bianchi y col. 1993.)

blasto embrionario de las otras células del epiblasto que revisten la **cavidad amniótica** (fig. 11-32B, C). Una vez que se completa el revestimiento del amnios, la cavidad amniótica se llena con una secreción denominada **líquido amniótico**, que sirve como amortiguador para el embrión en desarrollo mientras que evita su desecación. Se piensa que el epiblasto embrionario contiene todas las células que generarán el embrión verdadero y que es semejante en muchos sentidos al epiblasto de las aves.

Mediante la marcación de células individuales del epiblasto con peroxidasa de rábano, Kirstie Lawson y col. (1991) pudieron construir un mapa de destino detallado del epiblasto del ratón (véase fig. 1-6). La gastrulación comienza en el extremo posterior del embrión y es allí donde se forma el **nódulo*** (fig. 11-33). Como en las células del epiblasto del pollo, el mesodermo de mamíferos y el endodermo migran a través de la línea primitiva y como sus equivalentes de las aves, las células que migran del epiblasto de mamífero pierden la cadherina-E, se separan de sus vecinas y migran a través de la línea como células individuales (Burdsal y col. 1993). Las células que migran a través del nódulo dan origen a la notocorda. Sin embargo, en contraste con la formación de la notocorda en el pollo, se piensa que las células que forman la notocorda del ratón llegan a estar integradas en el endodermo del intestino primitivo (Jurand 1974; Sulik y col. 1994). Estas células pueden verse como una banda de células ciliadas pequeñas extendiéndose rostralmente desde el nódulo (fig. 11-34). Ellas forman la notocorda mediante convergencia medial y plegamiento desde el techo del intestino alejándose en dirección dorsal.

La migración y especificación parecen ser coordinadas por FGF. Las células de la línea primitiva parecen ser capaces de sintetizar y responder a los FGF (Sun y col. 1999; Ciruna y Rossant 2001). En embriones que son homocigotas para la pérdida del gen *fgf8*, las células no pueden migrar a través de la línea primitiva y no se forma mesodermo ni endodermo. FGF8 (y quizás otros FGF) probablemente controla los movimientos celulares hacia la línea primitiva al regular en menos a la cadherina-E que mantiene juntas a las células del epiblasto y este gen también controla la especificación celular al regular *snail*, *Brachyury* (*T*) y *Tbx6*, tres genes que son esenciales para la especificación y el establecimiento del patrón mesodérmico.

Los precursores ectodérmicos están localizados en una posición anterior a la línea primitiva completamente extendida, como en el epiblasto del pollo; sin embargo, en algunos ejemplos una sola célula da origen a descendientes en más de una capa germinal, o a derivados embrionarios y extraembrionarios. Por lo tanto, en el estadio de epiblasto, estos linajes no llegan a estar separados entre sí. Como en los embriones de aves, las células migran hacia el espacio entre las capas del hipoblasto y del epiblasto llegando a estar cubiertas con ácido hialurónico, que sintetizan a medida que dejan la línea primitiva. Esta sustancia actúa para mantenerlas separadas mientras migran (Solursh y Morriss 1977). Se piensa (Larsen 1993) que el reemplazo de las células hipoblásticas humanas por precursores endodérmicos se produce sobre los días 14-15 de gestación, mientras que la migración de células que forman el mesodermo no comienza hasta el día 16 (fig. 11-33C).

* En el desarrollo de los mamíferos, el nódulo de Hensen es denominado por lo general "el nódulo," a pesar de que Hensen descubrió esta estructura en los embriones de ratón.

Formación de las membranas extraembrionarias

Mientas que el epiblasto embrionario está experimentando movimientos celulares semejantes a los vistos en la gastrulación de reptiles o de aves, las células extraembrionarias están produciendo los tejidos claramente mamíferos que le permiten al feto sobrevivir dentro del útero materno. Aunque las células trofoblásticas iniciales de los ratones y de los seres humanos se dividen como la mayoría de las otras células del cuerpo, dan origen a una población de células en la que la división nuclear se produce ante la ausencia de citocinesis. Las células trofoblásticas originales constituyen una capa denominada el **citotrofoblasto**, mientras que el tipo celular multinucleado forma el **sincitiotrofoblasto**. El sincitiotrofoblasto se adhiere inicialmente al endometrio a través de una serie de moléculas de adhesión, como se vio antes. Además, estas células contienen enzimas proteolíticas que les permiten ingresar en la pared uterina y remodelar los vasos sanguíneos uterinos de modo que los vasos sanguíneos maternos bañan a los vasos sanguíneos fetales. Se piensa que el tejido del sincitiotrofoblasto favorece el avance del embrión hacia la pared uterina mediante la digestión del tejido uterino (Fisher y col. 1989). El útero, a su vez, envía vasos sanguíneos hacia esta área, donde finalmente contactan con el sincitiotrofoblasto. Poco tiempo después, el tejido mesodérmico se extiende hacia afuera desde el embrión gastrulando (véase fig. 11-32D). Estudios en embriones humanos y de mono rhesus han sugerido que el saco vitelino (y por lo tanto el hipoblasto) así como las células derivadas de la línea primitiva contribuyen a este mesodermo extraembrionario (Bianchi y col. 1993).

El mesodermo extraembrionario se une a las extensiones trofoblásticas y da origen a los vasos sanguíneos que transportan nutrientes desde la madre hacia el embrión. El estrecho pedículo de conexión del mesodermo extraembrionario que une el embrión al trofoblasto forma finalmente los vasos del **cordón umbilical.** El órgano extraembrionario completamente desarrollado, que consiste en tejido trofoblástico y mesodermo que contiene vasos sanguíneos, es denominado el corion, y se fusiona con la pared uterina para crear la placenta. Por lo tanto, la placenta tiene una porción materna (el endometrio uterino, que es modificado durante el embarazo) y un componente fetal (el corion). El corion puede estar en una aposición muy cercana a los tejidos maternos mientras todavía sigue siendo fácilmente separable de ellos (como en la placenta de contacto del cerdo), o éste puede estar tan íntimamente integrado con los tejidos maternos de tal modo que no puede separarse sin dañar a la madre y al feto en desarrollo (como en la placenta decidua de la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos).*

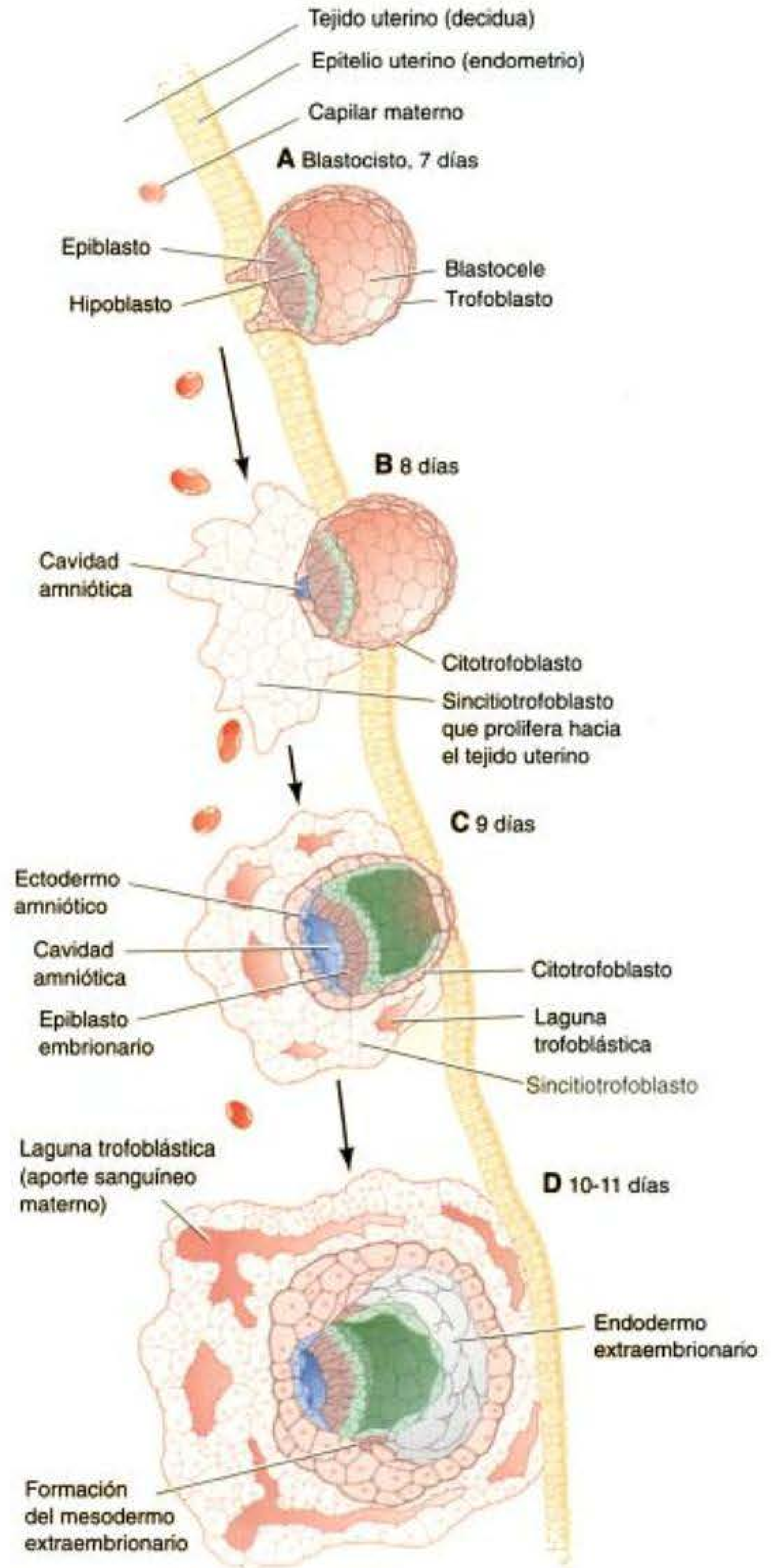


Fig. 11-32. Formación de tejido en el embrión humano entre los días 7 y 11. **A, B.** Blastocisto humano inmediatamente antes de la gastrulación. La masa celular interna se separa en células hipoblásticas que revisten el blastocele, formando el endodermo extraembrionario del saco vitelino primitivo y en un blastodisco de dos capas (epiblasto e hipoblasto) semejante al visto en embriones de aves. El trofoblasto se divide en citotrofoblasto, que formará las vellosidades y el sincitiotrofoblasto, que ingresará hacia el tejido uterino. **C.** Mientras tanto, el epiblasto se separa en el ectodermo amniótico (que rodea a la cavidad amniótica) y el epiblasto embrionario. Los mamíferos adultos forman las células del epiblasto embrionario. **D.** El endodermo extraembrionario forma el saco vitelino. El tamaño real del embrión en este estadio está cerca del período en la "figura 11-32."

* Hay numerosos tipos de placentas y las membranas extraembrionarias se forman de diferente modo en los distintos órdenes de mamíferos (véase Cruz y Pedersen 1991). Aunque los ratones y los seres humanos gastrulan y se implantan de un modo similar, sus estructuras extraembrionarias son características. Es muy arriesgado extrapolar fenómenos de desarrollo desde un grupo de mamíferos a otro. Incluso Leonardo da Vinci se vio atrapado (Renfree 1982). Sus destacados dibujos del feto humano dentro de la placenta son sensacionalmente artísticos, pero pobres científicamente: la placenta es la de una vaca.

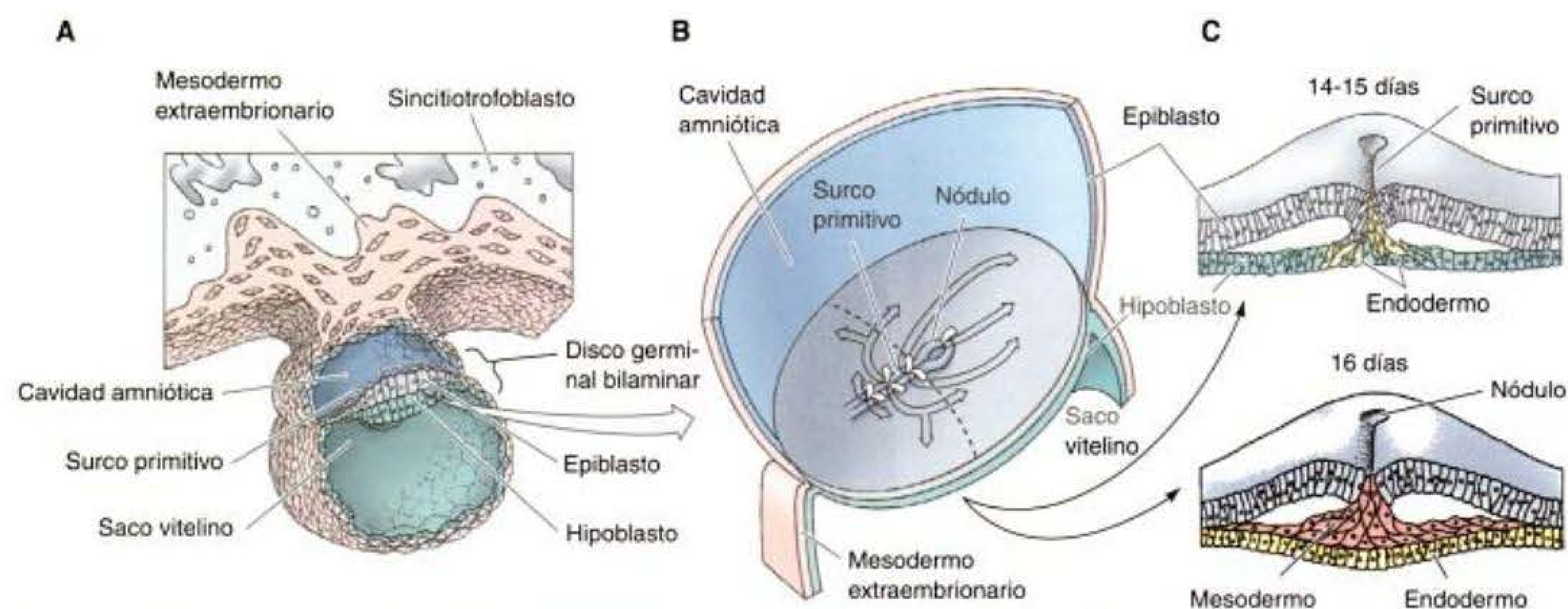


Fig. 11-33. Estructura del amnios y movimientos celulares durante la gastrulación humana. **A, B.** Embrión humano y conexiones uterinas en el día 15 de gestación. **A.** Sección sagital a través de la línea media. **B.** Vista que mira hacia abajo sobre la superficie dorsal del embrión. **C.** Los movimientos de las células epiblásticas a través de la línea primitiva y del nódulo de Hensen y debajo del epiblasto están superpuestos sobre la vista dorsal superficial. En los días 14 y 15, las células epiblásticas en ingresión se piensa que reemplazan a las células hipoblásticas (que contribuyen al revestimiento del saco vitelino), mientras que en el día 16, las células en ingresión se abren en abanico para formar la capa mesodérmica. (Según Larsen 1993.)

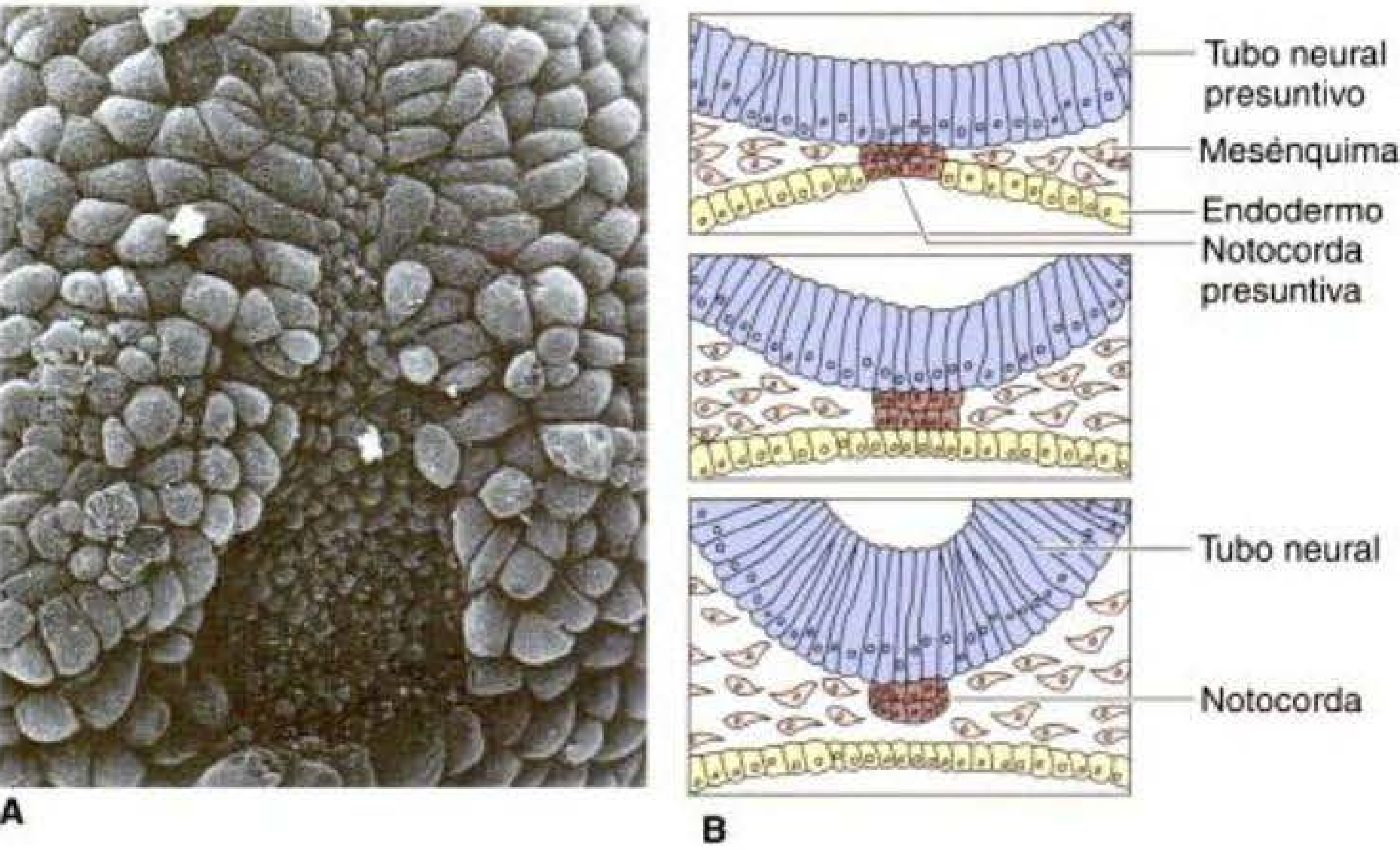


Fig. 11-34. Formación de la notocorda en el ratón. **A.** La superficie ventral de un embrión de ratón a los 7,5 días, vista con un microscopio electrónico de barrido. Las células de la notocorda presuntiva son las células pequeñas y ciliadas de la línea media que tienen a los lados a las células endodérmicas grandes del intestino primitivo. El nódulo (con sus células ciliadas) se observa en la parte inferior. **B.** Formación de la notocorda por el plegamiento hacia dorsal de las células pequeñas ciliadas. (De Sulik y col. 1994; microfotografía cortesía de K. Sulik y G. C. Schoenwolf.)

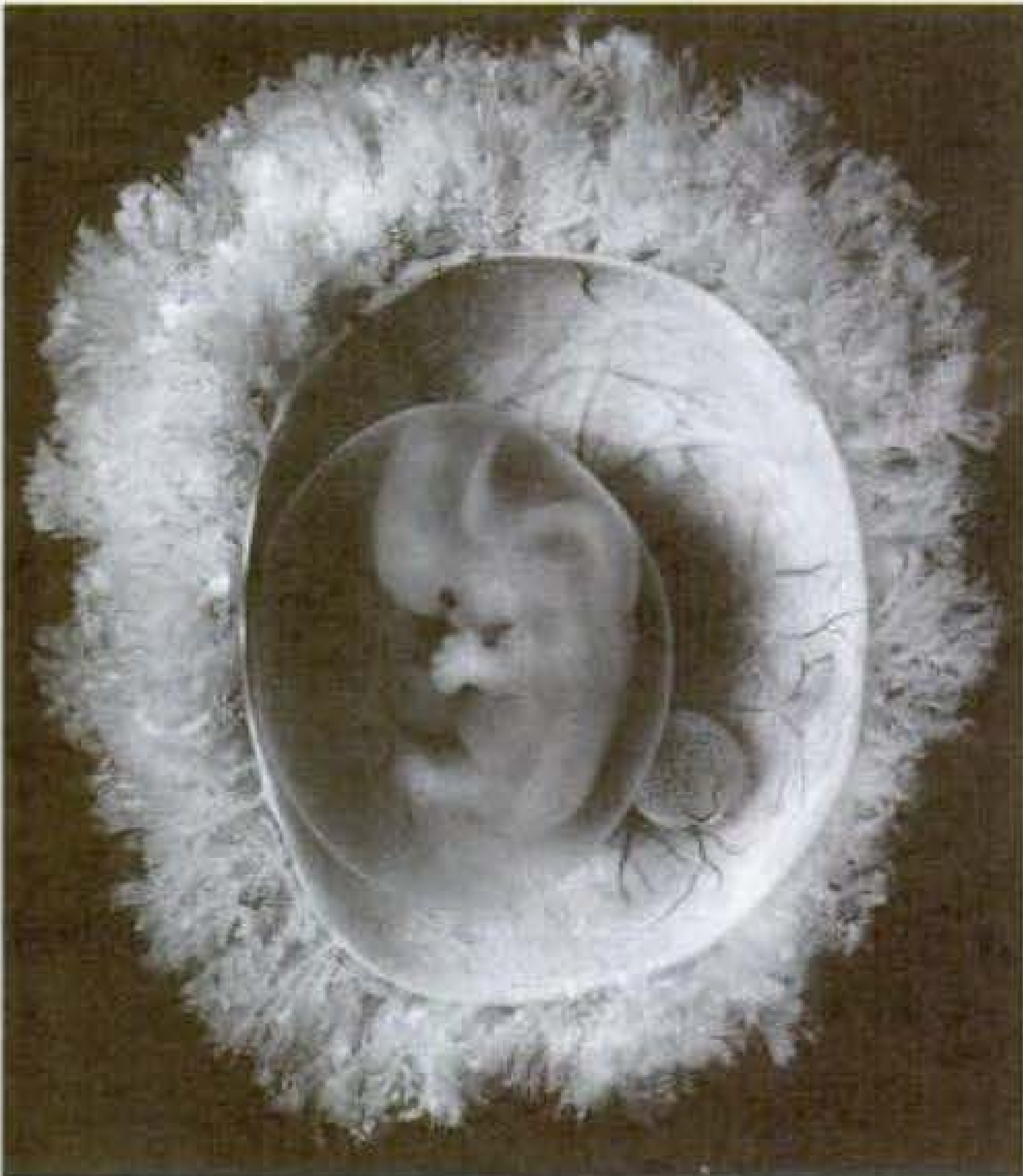


Fig. 11-35. Embrión humano y placenta después de 50 días de gestación. El embrión se encuentra dentro del amnios y pueden verse sus vasos sanguíneos extendiéndose hacia las vellosidades coriónicas. La esfera pequeña a la derecha del embrión es el saco vitelino. (The Carnegie Institution of Washington, cortesía de C. F. Reather.)

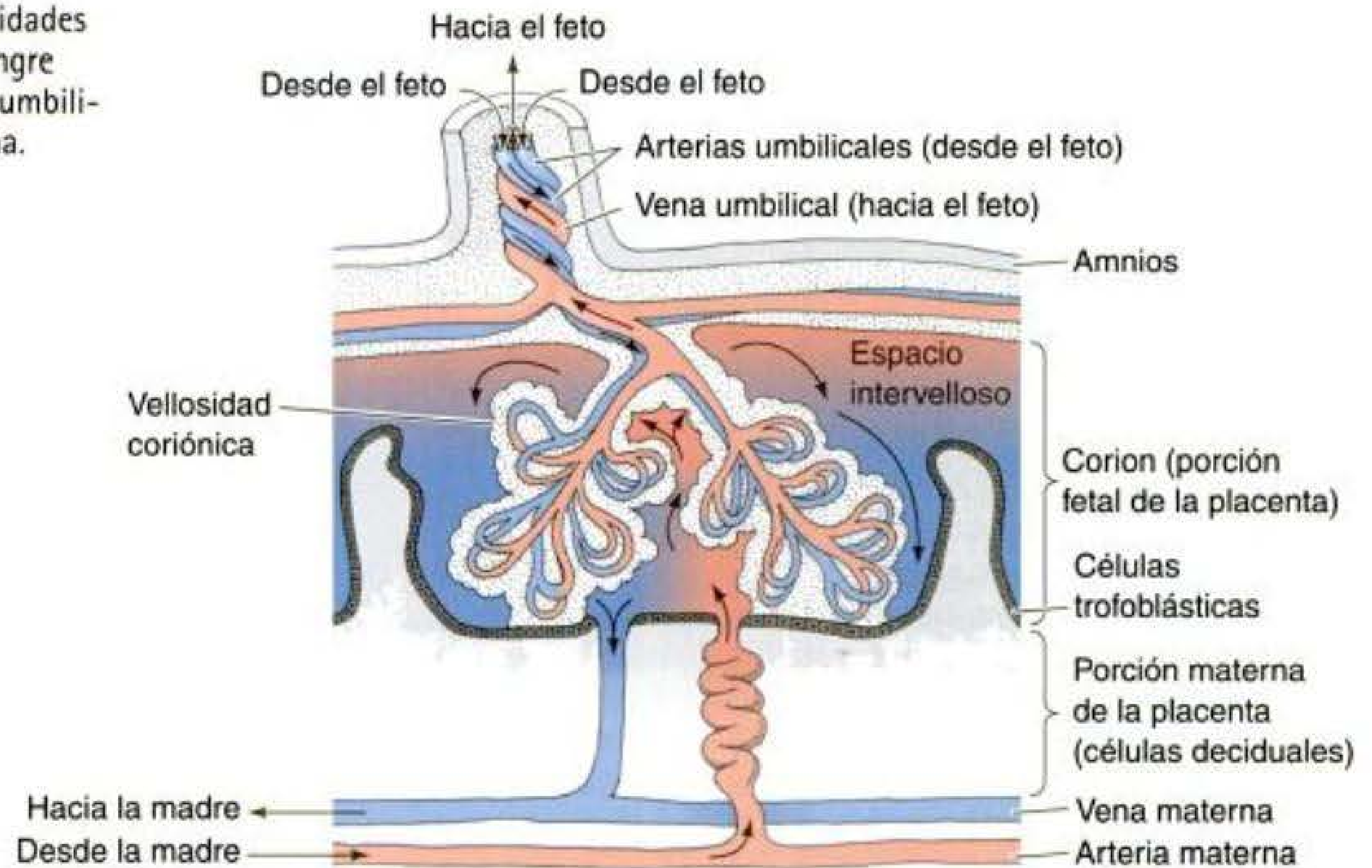


Fig. 11-36. Relación de las vellosidades coriónicas con el suministro de sangre materna en el útero. En el cordón umbilical hay dos arterias y una sola vena.

La figura 11-35 muestra las relaciones entre los tejidos embrionarios y extraembrionarios de un embrión humano de 6,5 semanas. Se ve el embrión recubierto por el amnios y protegido además por el corion. Se observan fácilmente los vasos sanguíneos extendiéndose hacia y desde el corion, al igual que las vellosidades que proyectan desde la superficie externa del corion. Estas vellosidades contienen los vasos sanguíneos y le permiten al corion tener una gran área expuesta a la sangre materna. Aunque los sistemas circulatorios fetal y materno normalmente nunca se fusionan, la difusión de las sustancias solubles puede tener lugar a través de las vellosidades (fig. 11-36). De este modo, la madre proporciona al feto nutrientes y oxígeno, y el feto envía los productos de desecho (principalmente dióxido de carbono y urea) hacia la circulación materna. Sin embargo, las células sanguíneas maternas y fetales normalmente no se mezclan.

SITIO WEB 11.6 **Funciones de la placenta (Placental functions).** Las placentas son órganos nutricionales, endocrinos e inmunológicos, proporcionan hormonas que le permiten al útero mantener el embarazo y además acelerar el desarrollo de la glándula mamaria. Las placentas también bloquean la potencial respuesta inmune de la madre contre el feto en desarrollo. Estudios recientes sugieren que la placenta utiliza varios mecanismos que bloquean la respuesta inmune de la madre.

Información adicional y especulaciones

Gemelos y células madre embrionarias

Las células tempranas del embrión pueden ser reemplazadas entre sí y compensar la pérdida de una célula. Esto fue demostrado por primera vez en 1952, cuando Seidel destruyó una célula de un embrión de ratón de 2 células y la célula restante producía un embrión entero. Una vez que la masa celular interna (MCI) ha llegado a separarse del trofoblasto, las células de la MCI constituyen un grupo equivalente. En otras palabras, cada célula de la MCI tiene el mismo potencial (en este caso, cada célula puede dar origen a todos los tipos celulares del embrión, pero no a los del trofoblasto), y sus destinos serán determinados por interacciones entre sus descendientes. Gardiner y Rossant (1976) además demostraron que si las células de la MCI (pero no las células del trofoblasto) eran inyectadas en los blastocistos, éstas contribuían al nuevo embrión. Debido a que las blastómeras de la MCI pueden generar cualquier tipo celular en el cuerpo, las células del blastocisto son referidas como pluripotentes (véase cap. 4).

Esta capacidad regulativa de las blastómeras de la MCI también se observa en humanos. Los gemelos humanos son clasificados en dos grupos principales: gemelos monocigóticos (un cigoto, o idéntico) y gemelos dicigóticos (dos cigotos, o fraternos). Los gemelos fraternos son el resultado de dos acontecimientos de fecundación separados, mientras que los gemelos idénticos son formados desde un único embrión cuyas células de algún modo llegan a estar disociadas una de la otra. Los gemelos idénticos pueden ser pro-

ducidos por la separación de blastómeras tempranas o incluso por la separación de la masa celular interna en dos regiones dentro del mismo blastocisto.

Se producen gemelos idénticos en aproximadamente el 0,25% de los nacimientos humanos. Cerca del 33% de los gemelos idénticos tienen dos corion completos y separados, lo que indica que la separación se produjo antes de la formación del tejido trofoblástico en el día 5 (fig. 11-37A). Los gemelos idénticos restantes comparten un corion en común, lo que sugiere que la separación se produjo dentro de la masa celular interna después de haberse formado el trofoblasto. Hacia el día 9, el embrión humano ha completado la construcción de otra capa extraembrionaria, el revestimiento del amnios. Este tejido forma el saco amniótico, que rodea al embrión con fluido amniótico y lo protege de la desecación y de los movimientos bruscos. Si la separación del embrión se hubiese producido después de la formación de corion en el día 5 pero antes de la formación del amnios en el día 9, entonces los embriones resultantes deberían tener un corion y dos amnios (fig. 11-37B). Esto sucede en cerca de los dos tercios de los gemelos humanos idénticos. Un pequeño porcentaje de gemelos idénticos nacen dentro de un único corion y amnios (fig. 11-37C). Esto significa que la división del embrión se produjo después del día 9. Estos recién nacidos tienen el riesgo de ser gemelos unidos ("siameses").

La capacidad para producir un embrión entero desde las células que normalmente deberían haber contribuido solamente a una porción del embrión es denominada regulación y es discutida en el capítulo 3. La regulación también se observa en la capacidad de dos o más embriones tempranos para formar una quimera individual en lugar de gemelos, trillizos o un individuo de múltiples cabezas. Los ratones quiméricos pueden ser producidos mediante agregación artificial de dos o más embriones en segmentación temprana (con frecuencia de 4 a 8 células) para formar un embrión compuesto. Como se muestra en la figura 11-38A, la zona pelúcida de dos embriones genéticamente diferentes puede quitarse artificialmente y los embriones reunidos para formar un blastocisto común. Los blastocistos son implantados luego en el útero de una madre adoptiva. Cuando ellos nacen, los quiméricos recién nacidos tienen algunas células de cada embrión. Esto se observa fácilmente cuando las blastómeras agregadas provienen de cepas de ratones que difieren en sus colores de pelaje. Cuando son agregadas blastómeras de cepas blancas y negras, el resultado es frecuentemente un ratón con bandas blancas y negras. Hay incluso evidencia (de la Chappelle y col. 1974; Mayr y col. 1979) que los embriones humanos pueden formar quimeras. Algunos individuos tienen dos tipos celulares genéticamente diferentes (XX y XY) dentro del mismo cuerpo, cada uno con su propio grupo de características definidas genéticamente. La explicación más simple para este fenómeno es que estos individuos resultan de la agregación de dos embriones, uno masculino y otro femenino, que se estaban desarrollando al mismo tiempo. Si esta explicación es correcta entonces

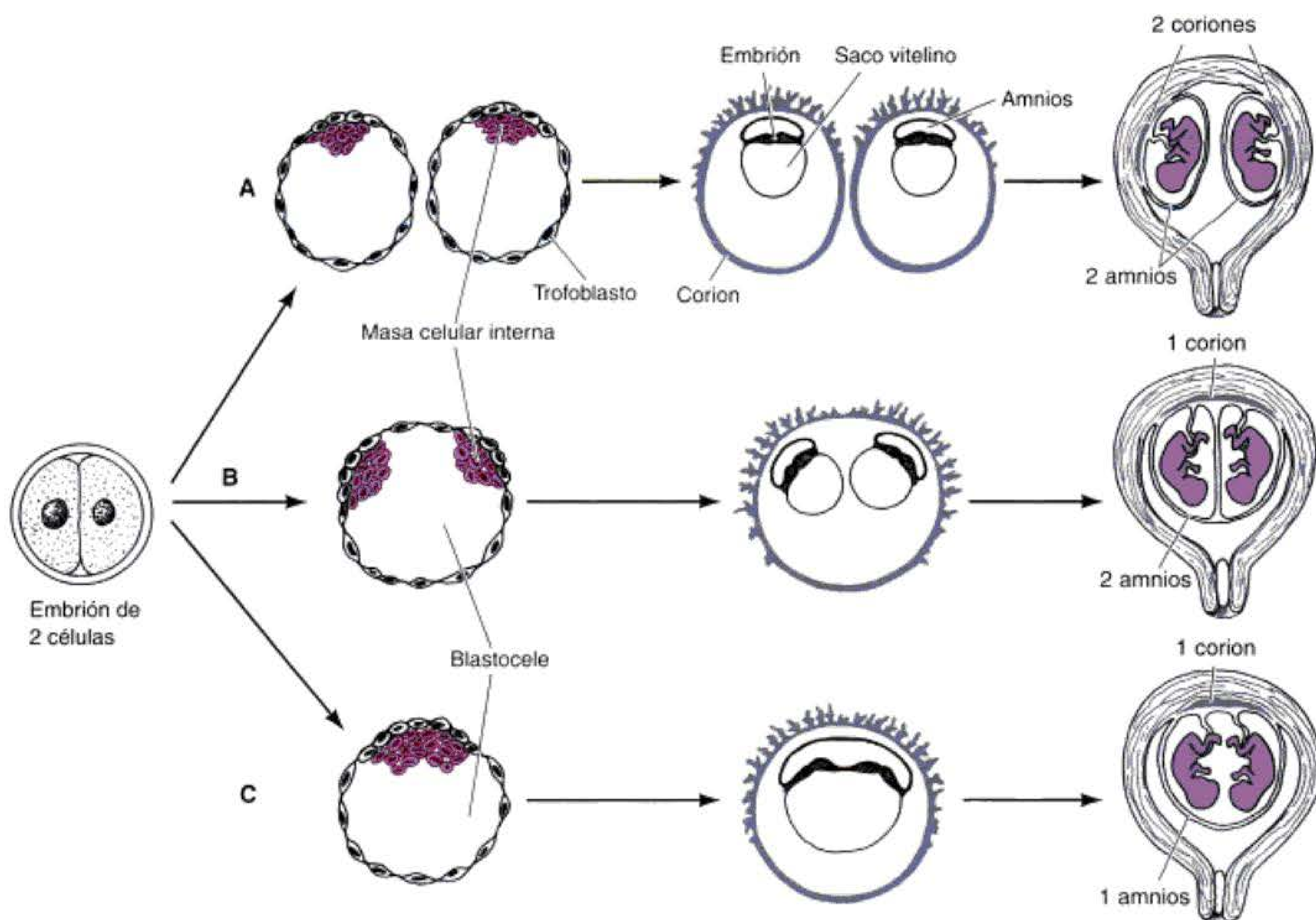


Fig. 11-37. Diagrama que muestra los tiempos de formación de gemelos monocigóticos en relación con las membranas extraembrionarias. **A.** La separación se produce antes de la formación del trofoblasto, de modo tal que cada gemelo tiene su propio corion y amnios. **B.** La separación se produce después de la formación del trofoblasto pero antes de la formación del amnios, lo que resulta en gemelos que tienen sacos amnióticos individuales pero comparten un corion. **C.** La separación después de la formación del amnios lleva a gemelos con un saco amniótico y un único corion. (Según Langman 1981).

los dos gemelos fraternos se habían fusionado para crear un único individuo compuesto.

Markert y Petters (1978) han demostrado que tres embriones tempranos de 8 células pueden unirse para formar una mórula compactada común y que el ratón resultante puede tener los colores de pelaje de las tres cepas diferentes (fig. 11-38B). Además, demostraron que cada uno de estos tres embriones da origen a los precursores de los gametos. Cuando un ratón hembra quimérico (negro/marrón/blanco) fue apareado con un macho white-furred (pelaje blanco, recesivo), se producían recién nacidos de cada uno de estos tres colores.

De acuerdo con las observaciones sobre la formación de gemelos y de ratones quiméricos, cada blastómera de la masa celular interna debería ser capaz de producir cualquier célula del cuerpo. Esta hipótesis ha sido confirmada y ha tenido consecuencias muy importantes para el estudio del desarrollo de los mamíferos. Cuando las células de la MCI son aisladas y crecen bajo ciertas condiciones, se mantienen indiferenciadas y continúan dividiéndose en cultivo (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981). Tales células son denominadas células madre embrionarias. Como se mostró en el capítulo 4, genes clonados pueden insertarse en los núcleos de estas células, o los genes existentes pueden ser mutados. Cuando estas células madre manipuladas son inyectadas en un blastocisto de ratón, pueden integrarse en la masa celular interna del huésped. El embrión obtenido tiene células que provienen del tejido huésped y del tejido donante. Esta técnica ha llegado a ser extremadamente importante en la determinación de la función de genes durante el desarrollo de los mamíferos.

SITIO WEB 11.7 **Gemelos monocigóticos no idénticos (Nonidentical monozygotic twins).** Aunque los gemelos monocigóticos tienen el mismo genoma, los factores al azar del desarrollo o el ambiente uterino pueden darles fenotipos espectacularmente diferentes.

SITIO WEB 11.8 **Gemelos unidos (Conjoined twins).** Hay acontecimientos poco comunes en los que es inducido más de un grupo de ejes en el mismo embrión. Estos acontecimientos pueden producir gemelos unidos; gemelos que comparten las mismas partes de sus cuerpos. Los temas médicos y sociales suscitados por los gemelos unidos proporcionan una mirada fascinante a lo que ha sido constituido "individualidad" a lo largo de la historia.

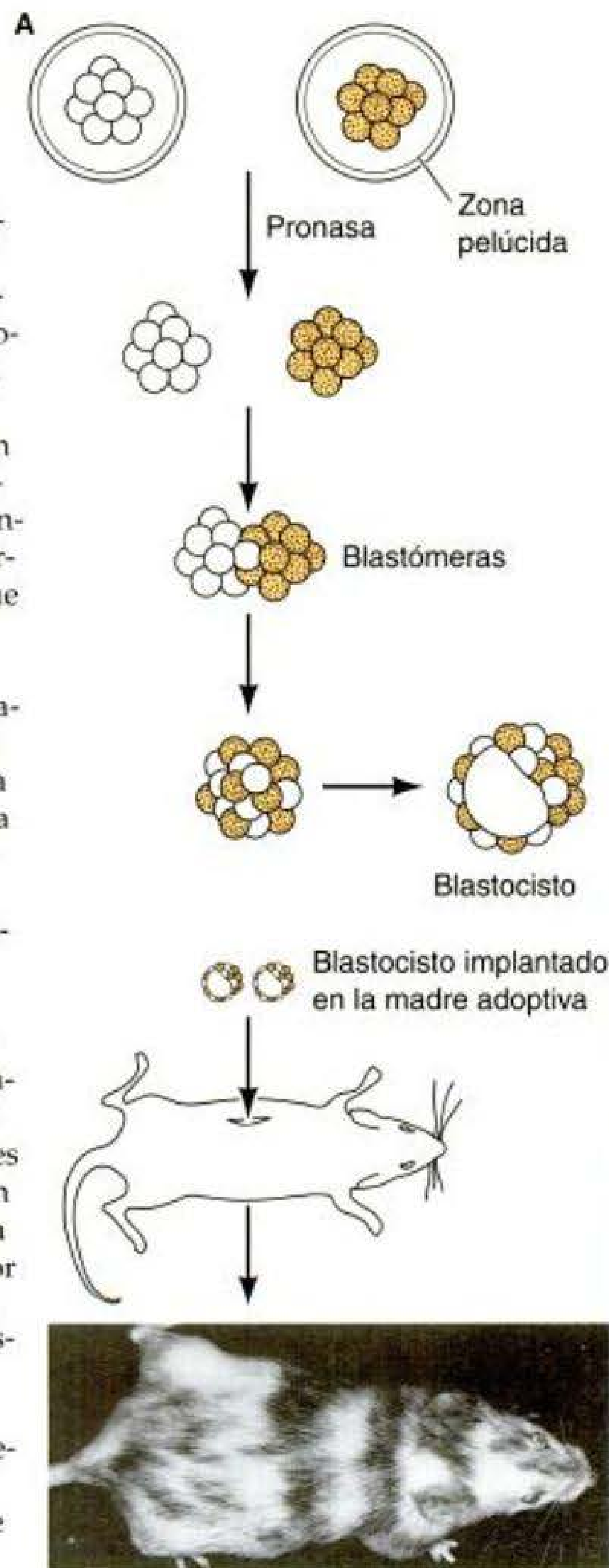




Fig. 11-38. Producción de ratones quiméricos. **A.** Procedimientos experimentales utilizados para producir ratones quiméricos. Embriones tempranos de 8 células de ratones genéticamente distintos (aquí, con diferentes colores de pelaje) son aislados de oviductos de ratón y reunidos después de que es quitada su zona pelúcida mediante enzimas proteolíticas. Las células forman un blastocisto compuesto, que es implantado en el útero de una madre adoptiva. La fotografía muestra una de las quimeras de ratón reales producidas de este modo. **B.** Un ratón quimérico hembra adulto (parte inferior) producido a partir de la fusión de tres embriones de 4 células: uno a partir de dos progenitores white-furred (pelaje blanco), uno a partir de dos progenitores black-furred (pelaje negro), y uno a partir de dos progenitores brown-furred (pelaje marrón). El embrión resultante tiene pelaje de colores a partir de los tres embriones. Además, cada embrión contribuyó a las células de la línea germinal, como es evidenciado por los tres colores de los recién nacidos (arriba) producidos cuando estas hembras quiméricas fueron apareadas con machos recesivos (white-furred). (**A**, fotografía cortesía de B. Mintz; **B**, de Markert y Petters 1978, fotografía cortesía de C. Markert.)

Formación del eje anteroposterior en los mamíferos

Dos centros señalizadores

La formación del eje anteroposterior de mamíferos ha sido estudiada lo más exhaustivamente posible en el ratón. Sin embargo, la estructura del epiblasto del ratón difiere de la de los humanos en que tiene forma de copa en lugar de forma de disco. La superficie dorsal del epiblasto (el ectodermo embrionario) contacta la cavidad amniótica, mientras que la superficie ventral del epiblasto contacta con el mesodermo recién formado. En esta disposición en forma de copa, el endodermo cubre la superficie del embrión sobre el lado "externo" de la copa (fig. 11-39A).

Los embriones de mamíferos parecen tener dos centros señalizadores: uno en el **nódulo** ("el organizador") y otro en el **endodermo visceral anterior** (**AVE**, del inglés *anterior visceral endoderm*) (fig. 11-39B; Beddington 1994). El nódulo (en la "parte inferior de la copa" en el ratón) parece ser responsable de la creación de todo el cuerpo, y los dos centros señalizadores trabajan juntos para formar la región anterior del embrión (Bachiller y col. 2000). Las posiciones de los dos centros señalizadotes parecen ser reguladas por interacciones entre el epiblasto y las membranas extraembrionarias. El posicionamiento del AVE es iniciado probablemente por las señales desde el ectodermo extraembrionario, que induce la expresión del gen *nodal* en el epiblasto por debajo de éste. Las proteínas Nodal dentro del epiblasto activan la expresión de posteriores genes que son necesarios para la formación del mesodermo. Ellas también inducen el establecimiento del patrón del endodermo visceral que rodea al mesodermo, promoviendo la formación del AVE (Brennan y col. 2001). La formación del nódulo es dependiente del trofoblasto. Las células del trofoblasto producen la proteína Arkadia, una proteína nuclear que es crítica en la formación de una señal que induce al nódulo en el epiblasto (Episkopou y col. 2001). Por lo tanto, en mamíferos los tejidos extraembrionarios son críticos en la polarización del embrión y en la formación de sus dos principales centros de señalización.

El nódulo y el endodermo visceral anterior del ratón expresan muchos de los genes que según se conoce son expresados en los tejidos organizadores de la rana y del pollo. El nódulo produce cordina y Nogina (el AVE no lo hace), mientras que el AVE expresa varios genes que son necesarios para la formación de la cabeza. Éstos incluyen a los genes para los factores de transcripción Hesx1, Lim-1 y Otx2, así como los genes para el factor paracrino Cerberus (Perea-Gomez y col. 2001). El endodermo visceral anterior es establecido antes del nódulo y la línea primitiva (con su nódulo) se forma siempre sobre el lado del epiblasto *opuesto* al AVE. Homocigotas para alelos

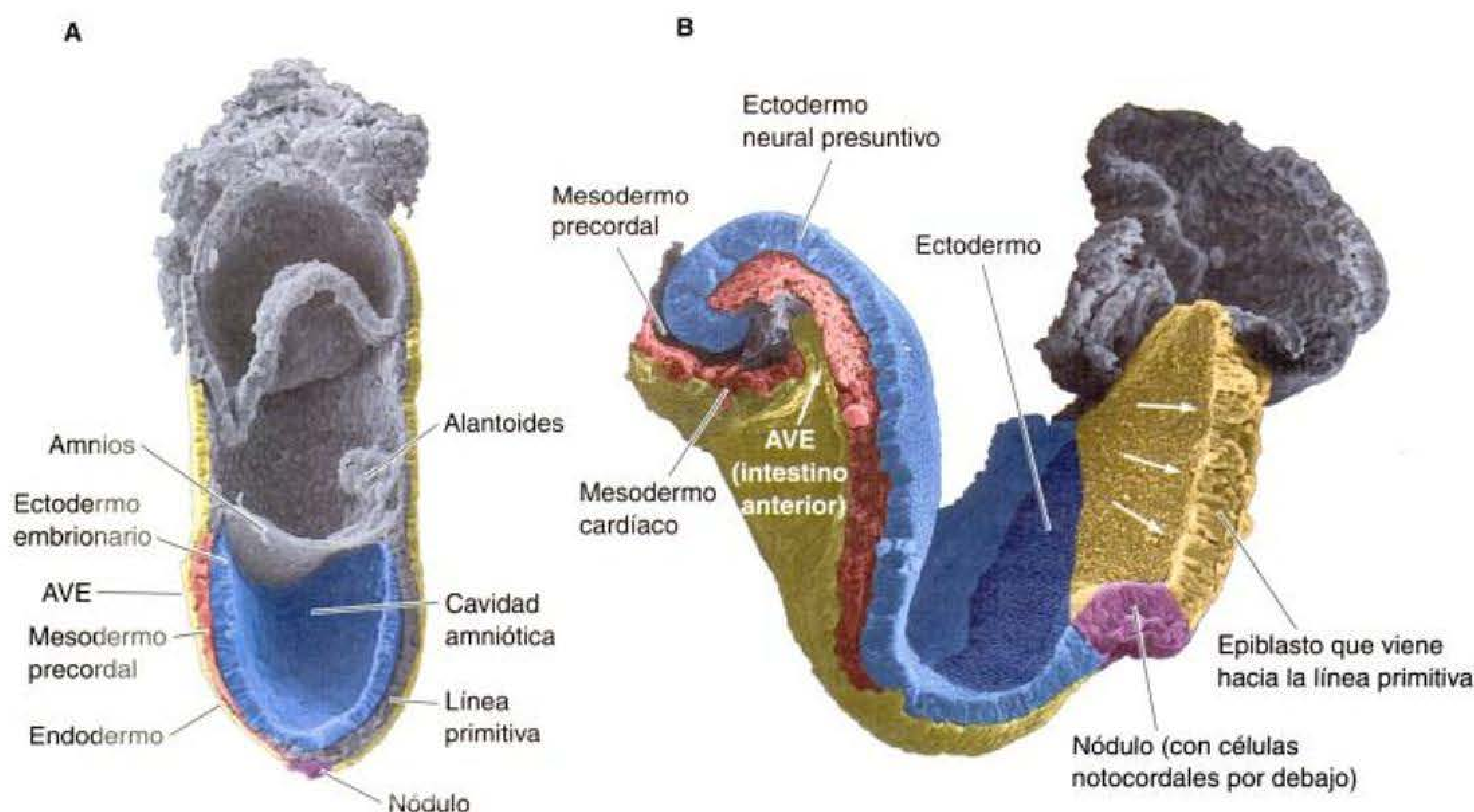


Fig. 11-39. Formación del eje en el ratón. **A.** En el embrión de ratón de 7 días, la superficie dorsal del epiblasto (ectodermo embrionario) está en contacto con la cavidad amniótica. La superficie ventral del epiblasto contacta al mesodermo recién formado. En esta disposición parecida a una copa, el endodermo cubre la superficie del embrión. El nódulo está en la parte inferior de la copa y éste ha generado el cordamesodermo. Los dos centros señalizadores, el nódulo y el endodermo visceral anterior (AVE), están localizados sobre los lados opuestos de la copa. Finalmente, la notocorda los conectará. El lado caudal del embrión está marcado por la presencia del alantoides. **B.** Hacia el día 8 embrionario, el endodermo visceral anterior reviste al intestino anterior y el mesodermo precordal está ahora en contacto con el ectodermo del cerebro anterior. El nódulo está ahora más lejos caudalmente, debido en gran parte al crecimiento rápido de la porción anterior del embrión. Las células en la línea media del epiblasto migran a través de la línea primitiva (flechas blancas). (Microfotografías cortesía de K. Sulik.)

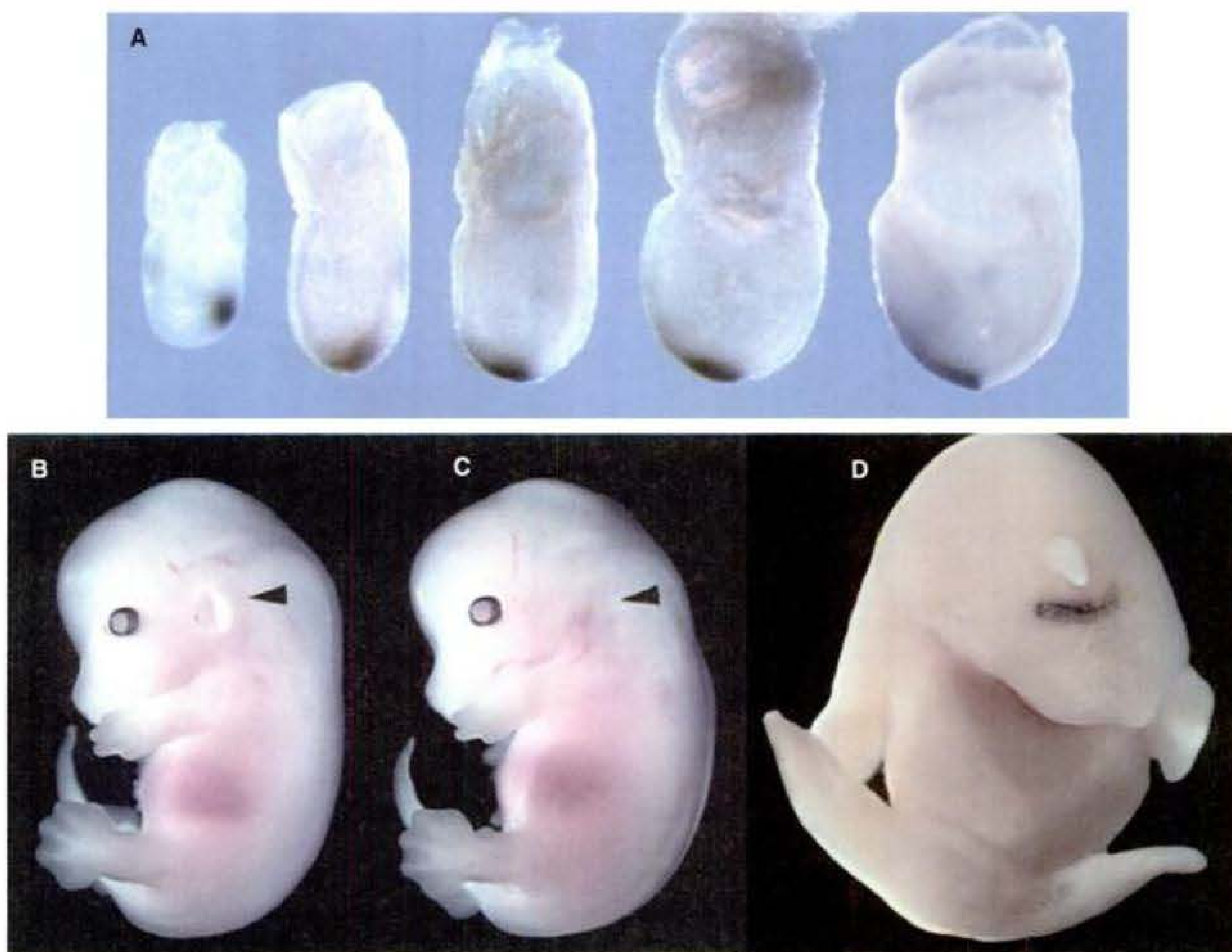


Fig. 11-40. Expresión de los antagonistas de BMP en el nódulo de mamíferos. **A.** La expresión de cordina durante la gastrulación se observa en la línea primitiva anterior, el nódulo y el mesodermo axial. Ésta no es expresada en el endodermo visceral anterior. **B-D.** Fenotipos de embriones de 12,5 días. **B.** Embrión tipo salvaje. **C.** El embrión con el knockout del gen *cordina* tiene una oreja defectuosa pero una cabeza por lo demás normal. **D.** Fenotipo de un ratón deficiente en *cordina* y *nogina*. No hay mandíbula y hay un ojo único localizado centralmente, sobre el cual sobresale una probóscide grande (nariz). (Según Bachiller y col. 2000; fotografías cortesía de E. M. De Robertis.)

mutantes de cualquiera de los genes específicos de la cabeza antes mencionados del AVE producen ratones carentes de cerebros anteriores (Thomas y Beddington 1996; Beddington y Robertson 1999). Mientras que los knockouts de *cordina* o *nogina* no afectan el desarrollo, ratones con la ausencia de *ambos* genes desarrollan un cuerpo carente de cerebro anterior, nariz y estructuras faciales (fig. 11-40). Es probable que el AVE funcione en el epiblasto para restingir la señal Nodal, y permitir de este modo que sean expresados los genes anteriores en la porción anterior del epiblasto. Hacia la mitad del día 6, la región alrededor del nódulo ha sido inducida a expresar el factor de transcripción Crypto, mientras que el área alrededor del AVE expresa el factor de transcripción Otx. De este modo, el embrión es definido en regiones anterior-posterior (fig. 11-41; Perea-Gomez y col. 2001; Kimura y col. 2001).

Establecimiento del patrón del eje anteroposterior: la hipótesis del código Hox

Una vez comenzada la gastrulación, comienza a especificarse en todos los vertebrados la polaridad anteroposterior mediante la expresión de los **genes Hox**. Los genes Hox son homólogos a los genes selectores homeóticos (Hom-C) de la mosca de la fruta (véase cap. 9). El complejo génico homeótico de *Drosophila* sobre el cromosoma 3 contiene a los grupos de genes homeóticos de Antennapedia y bithorax (véase fig. 9-27), y pueden verse como unidades funcionales individuales. (En efecto, en otros insectos como el escarabajo de la harina *Tribolium*, éste es fisiológicamente una sola unidad.) Los genes Hom-C están dispuestos en el mismo orden general que su patrón de expresión a lo largo del eje anteroposterior, siendo el gen más 3' (*labial*) requerido para la producción de la estructura más anterior y el gen más 5' (*AbdB*), para especificar el desarrollo del abdomen posterior. Los genomas de ratón y humanos contienen cuatro copias del complejo Hox por juego haploide, localizados sobre cuatro cromosomas diferentes (*Hoxa* hasta *Hoxd* en ratón, *HOXA* hasta *HOXD* en humanos, véase Boncinelli y col. 1988, McGinnis y Krumlauf 1992; Scott 1992). No solo se encuentran en las moscas y en mamíferos los mismos tipos generales de genes homeóticos, sino que el orden de estos genes sobre sus respectivos cromosomas es destacadamente similar. Además, la expresión de estos genes sigue el mismo patrón: los genes de mamíferos homólogos a los genes de *Drosophila labial*, *proboscipedia* y *deformed* son expresados anteriormente, mientras que los genes que son homólogos al gen de *Drosophila Abd-B* son expresados posteriormente. Otra serie de genes que controlan la formación de la cabeza de la mosca (*ortho-*

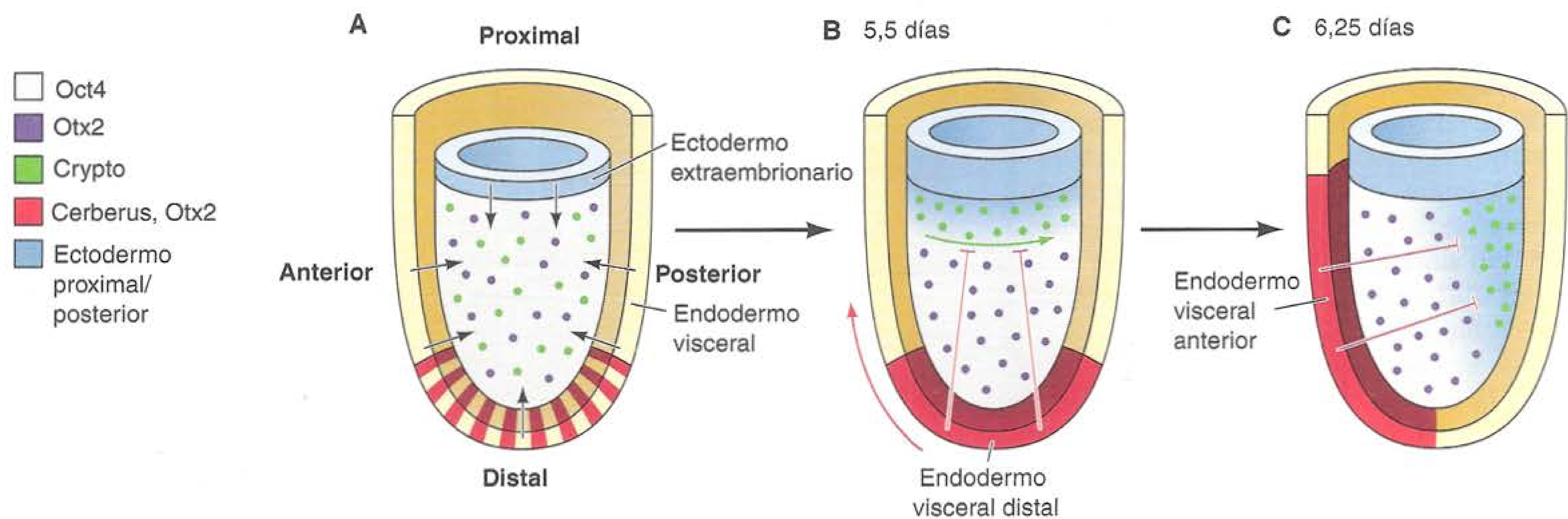


Fig. 11-41. Modelo esquemático de las interacciones entre el endodermo visceral y el epiblasto en los ratones. **A.** La proteína nodal del epiblasto establece el patrón del endodermo visceral de su alrededor. Todas las células del epiblasto sintetizan los factores de transcripción Oct4, Crypto y Otx2. Los genes formadores de la cabeza *Cerberus* y *otx2* son expresados en el extremo distal del epiblasto y comienzan a establecer su patrón. **B.** A los 5,5 días (1 día antes de la formación de la línea primitiva), el endodermo visceral distal (DVE) puede impedir la expresión de *crypto* en la porción distal del epiblasto. **C.** A medida que la rotación del endodermo visceral hace que las regiones distales se conviertan en el AVE, el factor de transcripción Crypto llega a ser reducido a aquellas células que estarán en el extremo anterior del embrión. (Según Kimura y col. 2001.)

denticle y *empty spiracles*) tienen homólogos en el ratón que muestran expresión en el cerebro medio y en el cerebro anterior.

Mientras que los genes Hox parecen especificar el eje anteroposterior a lo largo de los vertebrados, aquí se discutirá sobre mamíferos, debido a que la evidencia experimental es particularmente fuerte para esta clase. Los genes Hox/HOX de mamíferos son enumerados del 1 al 13, comenzando desde el extremo de cada complejo que es expresado más anteriormente. La figura 11-42 muestra las relaciones entre la serie génica homeótica de *Droshophila* y del ratón. Los genes equivalentes en cada complejo de ratón (como *Hoxa-1*, *Hoxb-1* y *Hoxd-1*) son denominados un **grupo parálogo**. Se piensa que los cuatro complejos Hox de mamíferos fueron formados a partir de duplicaciones de cromosomas. Debido a que no hay una correspondencia uno a uno entre los genes Hom-C de *Drosophila* y los genes Hox del ratón, es probable que se hayan producido duplicaciones independientes de genes debido a que estas dos ramificaciones animales se separaron (Hunt y Krumlauf 1992; véase cap. 23).

Expresión de los genes Hox a lo largo del eje dorsal

La expresión del gen Hox puede ser vista a lo largo del eje dorsal (en el tubo neural, en la cresta neural, en el mesodermo paraxial y en el ectodermo superficial) a partir del límite anterior del cerebro posterior (rombencéfalo) a través de la cola. Las diferentes regiones del cuerpo desde el cerebro medio hacia la cola están caracterizadas por diferentes constelaciones de expresión de genes Hox y se piensa que el patrón de expresión de genes Hox especifica las diferentes regiones. En general, los genes del grupo parálogo 1 son expresados desde la punta de la cola hacia el borde más anterior del cerebro posterior (rombencéfalo). Los genes parálogos 2 son expresados a lo largo de la médula espinal, pero el límite anterior de expresión se detiene dos segmentos más caudalmente que los genes parálogos 1 (véase fig. 11-42; Wilkinson y col. 1989; Keynes y Lumsden 1990). Los Hox parálogos de enumeración más elevada son expresados únicamente en las regiones posteriores del tubo neural, donde ellos también forman un grupo "anidado".

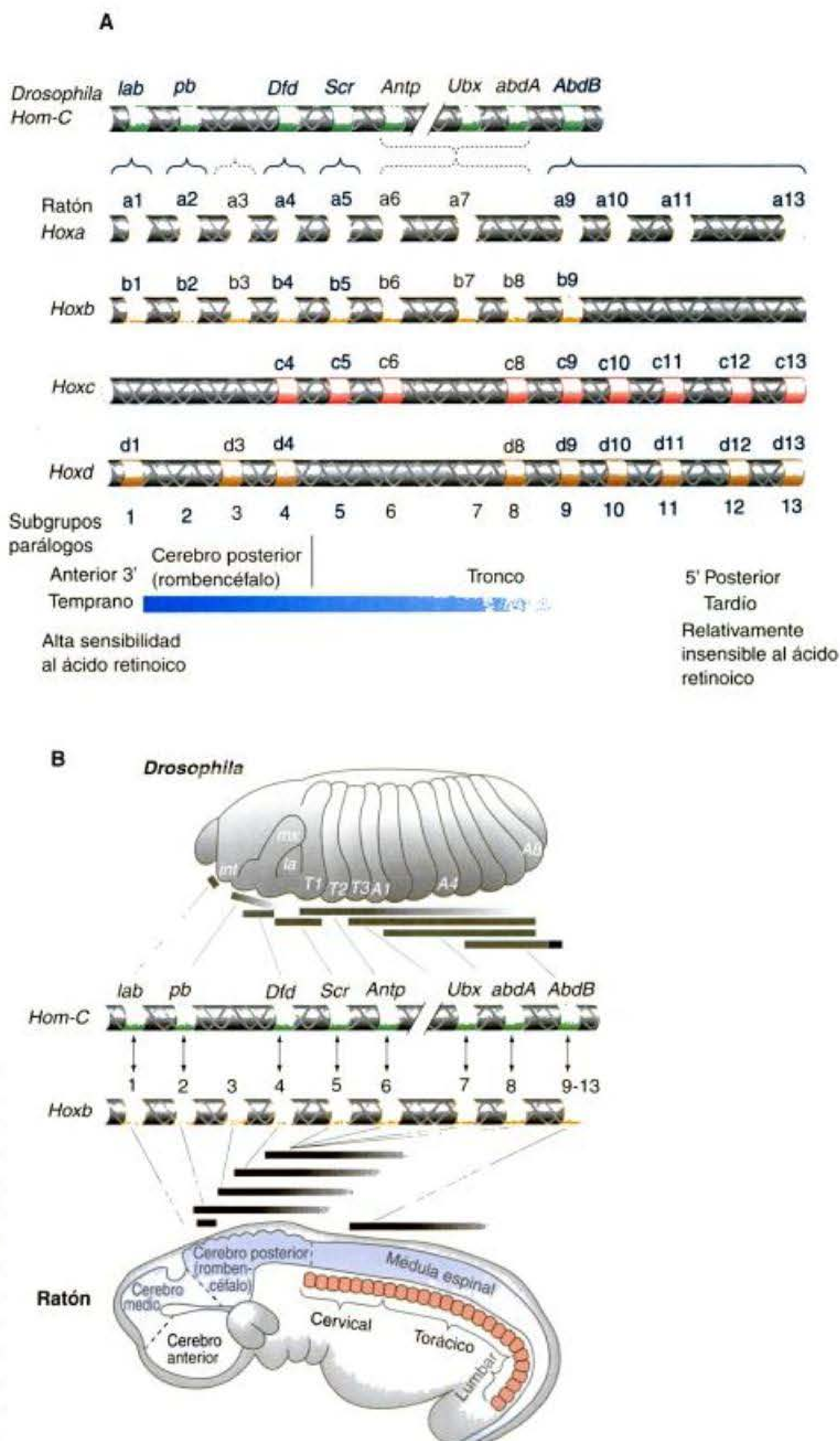
Análisis experimental del código Hox

Los patrones de expresión de los genes Hox murinos sugieren un código por el cual ciertas combinaciones de los genes Hox especifican una región particular del eje anteroposterior (Hunt y Krumlauf 1991). Series particulares de genes parálogos proporcionan identidad segmentaria a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo. Evidencia para tal código proviene de tres fuentes:

- Experimentos de inactivación génica dirigida o "knockout" (véase cap. 4), en los que se construyeron ratones que carecían de ambas copias de uno o más genes Hox.
- Ácido retinoico y teratogénesis, en los que los embriones de ratón expuestos al ácido retinoico mostraban un patrón atípico de expresión de los genes Hox a lo largo del eje anteroposterior y una diferenciación anormal de sus estructuras axiales.
- Anatomía comparada, en la que los tipos de vértebras en las diferentes especies de vertebrados están correlacionadas con la constelación de expresión génica Hox.

INACTIVACIÓN GÉNICA DIRIGIDA. Cuando Chisaka y Capecchi (1991) hicieron el knockout del gen *Hoxa-3* a partir de ratones endogámicos (criados en consanguinidad), los mutantes homocigotas resultantes murieron poco después del nacimiento. Las autopsias de estos ratones revelaron que sus cartílagos del cuello eran anormalmente cortos y gruesos y que ellos tenían timos, tiroides y glándulas paratiroides severamente deficientes o ausentes (fig. 11-43). El corazón y los principales vasos san-

Fig. 11-42. Conservación evolutiva de la organización y de la expresión transcripcional génica homeótica en las moscas de la fruta y en los ratones. **A.** Semejanzas entre los grupos Hom-C sobre el cromosoma 3 de *Drosophila* y los cuatro grupos de los genes Hox en el genoma del ratón. Las regiones sombreadas muestran específicamente fuertes semejanzas estructurales entre especies y se puede ver que el orden de estos genes sobre los cromosomas ha sido conservado. Los genes en el extremo 5' (debido a que todos los genes Hox de ratón son transcritos en la misma dirección) son los expresados en regiones más posteriores, más tardíamente y pueden ser inducidos solo por altas dosis de ácido retinoico. Los genes que tienen estructuras semejantes, la misma posición relativa sobre cada uno de los cuatro cromosomas y patrones de expresión similares pertenecen al mismo grupo parálogo. **B.** Comparación de los patrones de transcripción de los genes *Hom-C* y *Hoxb* de *Drosophila* (a las 10 horas) y ratones (a los 12 días), respectivamente. Los genes homólogos humanos son denominados genes *HOX* (en mayúscula). (**A**, según Krumlauf 1993; **B**, según McGinnis y Krumlauf 1992.)



guíneos estaban también malformados. Análisis posteriores mostraron que no estaban afectados el número y la migración de las células de la cresta neural que normalmente forman estas estructuras. En su lugar, parece ser que los genes *Hoxa-3* son responsables de la especificación del destino de las células de la cresta neural craneal y de permitirles a estas células diferenciarse y proliferar hacia cartílago del cuello y a las glándulas que se forman a partir de la cuarta y sexta bolsas faríngeas (Manley y Capecchi 1995).

El knockout del gen *Hoxa-2* también produce ratones cuyas células de la cresta neural han sido reespecificadas, pero los defectos en estos ratones son anteriores de los vistos en los knockouts de *Hoxa-3*. Los elementos craneales formados normalmente por las células de la cresta neural del segundo arco faríngeo (los huesos del estribo, y la apófisis estiloide) han desaparecido y son reemplazados por la duplicación de las estructuras del primer arco faríngeo (yunque, martillo, etc.) (Gendron-Maguire y col. 1993; Rijli y col. 1993). Por lo tanto, sin ciertos genes Hox, algunos órganos regionalmente específicos a lo largo del eje anteroposterior no se llegan a formar, o llegan a ser reespecificados como otras regiones. Del mismo modo, cuando se hace el knockout del gen *Hoxc-8* (Le Mouellic y col. 1992), varios segmentos esqueléticos axiales se asemejan a segmentos más anteriores, bastante parecido a lo que se observa en las mutaciones homeóticas de pérdida de función de *Drosophila*. Como se puede ver en la figura 11-44, la primera vértebra lumbar de tal ratón ha formado una costilla –algo característico de las vértebras torácicas anteriores a ésta.

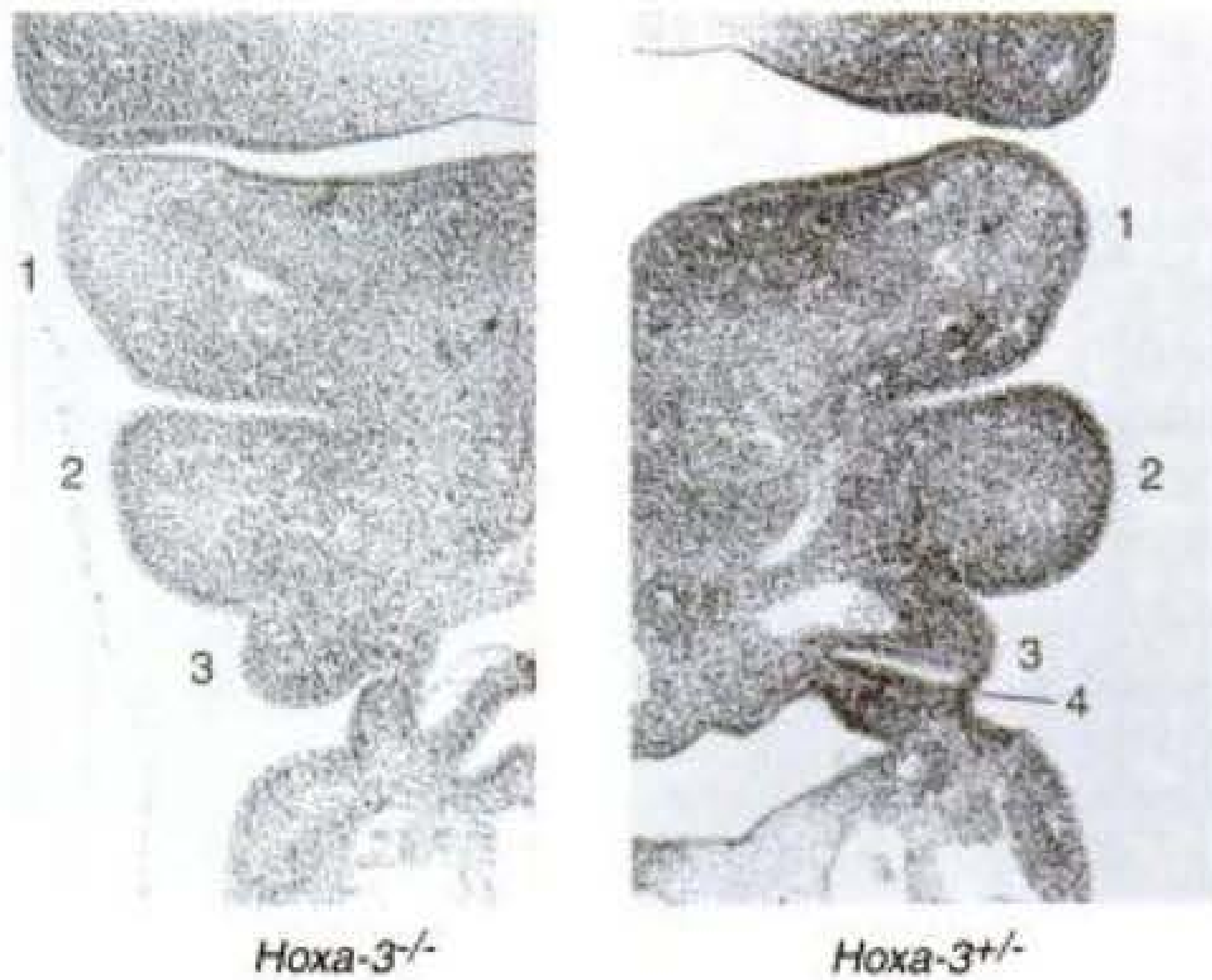


Fig. 11-43. Desarrollo insuficiente de las estructuras del arco y de la bolsa faríngea derivadas de la cresta neural en ratones deficientes de *Hoxa-3*. Los arcos están enumerados. (Derecha) Un embrión de 10,5 días de un ratón *Hoxa-3* heterocigota (tipo salvaje), que muestra el desarrollo normal de la bolsa 3 (timo), de la bolsa 4 (paratiroides) y de otras estructuras. (Izquierda). Un mutante homocigota deficiente de *Hoxa-3* de ratón que carece de un desarrollo apropiado de estas estructuras. (De Chisaka y Capecchi 1991.)

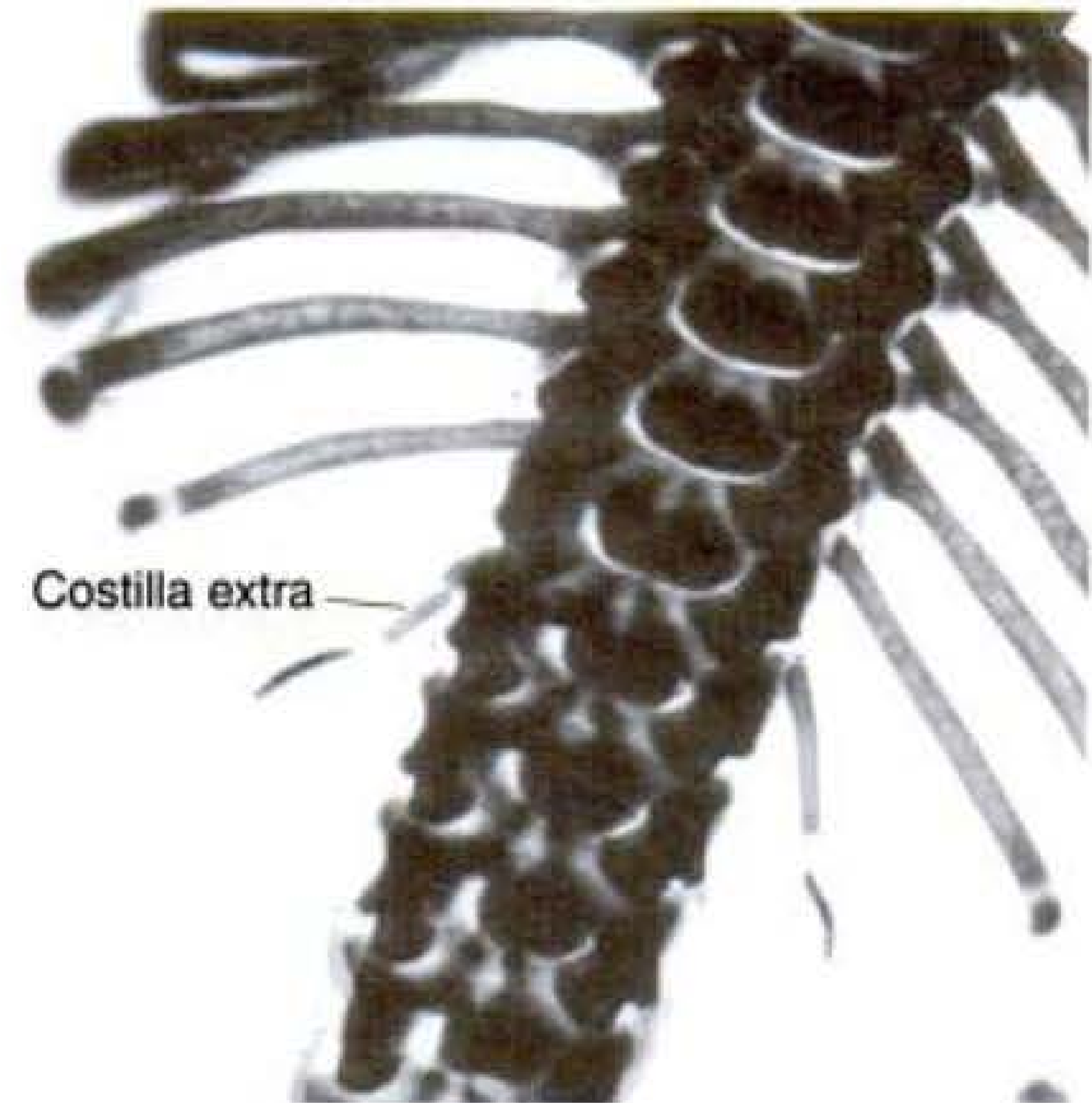


Fig. 11-44. Transformación parcial de la primera vértebra lumbar a vértebra torácica por el knockout del gen *Hoxc-8*. La primera vértebra lumbar de este ratón ha formado una costilla; una estructura normalmente formada solo por las vértebras torácicas anteriores a ésta. (De Le Mouellic y col. 1992; fotografía cortesía de los autores.)

Se pueden obtener varias transformaciones axiales mediante el knockout de dos o más genes de un grupo parálogo. Los ratones homocigotas para la eliminación de *Hoxd-3* tienen anomalías leves de la primera vértebra cervical (el atlas), mientras que los ratones homocigotas para la eliminación de *Hoxa-3* no tienen anomalías de este hueso, sin embargo tienen otras malformaciones (véase antes). Cuando ambas series de mutaciones son reproducidas en el mismo ratón, ambos grupos de problemas llegan a ser más severos. Los ratones sin *Hoxa-3* ni *Hoxd-3* no tienen hueso atlas y el cartílago hioides y tiroides son tan reducidos en tamaño que hay brechas o agujeros en el esqueleto (Condie y Capecchi 1994; Greer y col. 2000). Parece ser que hay interacciones entre los productos de los genes Hox, y que en algunas funciones, uno de los parálogos puede reemplazar al otro.

Por lo tanto, la evidencia de los knockouts génicos apoya la hipótesis de: 1) que diferentes series de genes Hox son necesarios para la especificación de cualquier región del eje anteroposterior, 2) que los miembros de un grupo parálogo de genes Hox pueden ser responsables de los diferentes subgrupos de órganos dentro de estas regiones, y 3) que los defectos causados por el knockout de genes Hox particulares se producen en la región de expresión más anterior de estos genes.

ÁCIDO RETINOICO Y TERATOGÉNESIS. Cambios homeóticos también son observados cuando los embriones de ratón son expuestos a dosis teratogénicas de ácido retinoico (AR), un derivado de la vitamina A. Hacia el día 7 de desarrollo, ha sido establecido un gradiente de AR que es elevado en las regiones posteriores y bajo en las porciones anteriores del embrión (Sakai y col. 2001). Este gradiente parece ser controlado por la síntesis o degradación diferencial de AR en las diferentes partes del embrión. Varios genes Hox tienen sitios receptores de ácido retinoico en sus potenciadores y ácido retinoico exógeno administrado a embriones de ratón intra útero puede hacer que ciertos genes Hox lleguen a expresarse en grupos de células que frecuentemente no los expresan (Conlon y Rossant 1992; Kessel 1992). Además, pueden imitarse anomalías craneofaciales de embriones de ratón expuestos a dosis teratogénicas de AR (fig. 11-45) al causar la expresión de *Hoxa-7* a lo largo de todo el embrión (Balling y col. 1989). El AR exógeno debería imitar las concentraciones normalmente halladas solamente por las células posteriores. Si altas dosis de AR pueden activar a los genes Hox en localizaciones inapropiadas a lo largo del eje anteroposterior, y si la constelación de los genes Hox activos especifican la región del eje anteroposterior, entonces a los ratones a los que se les dio AR intra útero deberían mostrar transformaciones homeóticas manifestadas como malformaciones rostralizadas producidas a lo largo del eje anteroposterior.

Kessel y Gruss (1991) hallaron que éste era el caso. Los ratones tipo salvaje tenían 7 vértebras cervicales (cuello), 13 vértebras torácicas (con costillas) y 6 lumbares (abdominal), además de las vértebras sacras y caudales (cola). En los embriones expuestos a AR en el día 8 de gestación (durante la gastrulación), la primera o dos vértebras lumbares fueron transformadas hacia vértebras torácicas (con costillas), mientras que la primera vértebra sacra frecuentemente se convertía en una vértebra lumbar. En algunos casos, la región posterior de la totalidad del embrión no se llega a formar (fig. 11-45E). Estos cambios en la estructura fueron correlacionados con cambios en la constelación de los genes Hox expresados en estos tejidos. Por ejemplo, cuando fue administrado AR a los embriones en el día 8, la expresión de *Hoxa-10* fue desplazada hacia posterior y se formó un grupo de costillas adicionales sobre lo que tendría que haber sido la primera vértebra lumbar. Cuando los genes Hox posteriores no fueron expresados en su totalidad, la parte caudal del embrión no se llegaba a formar. La evidencia se-

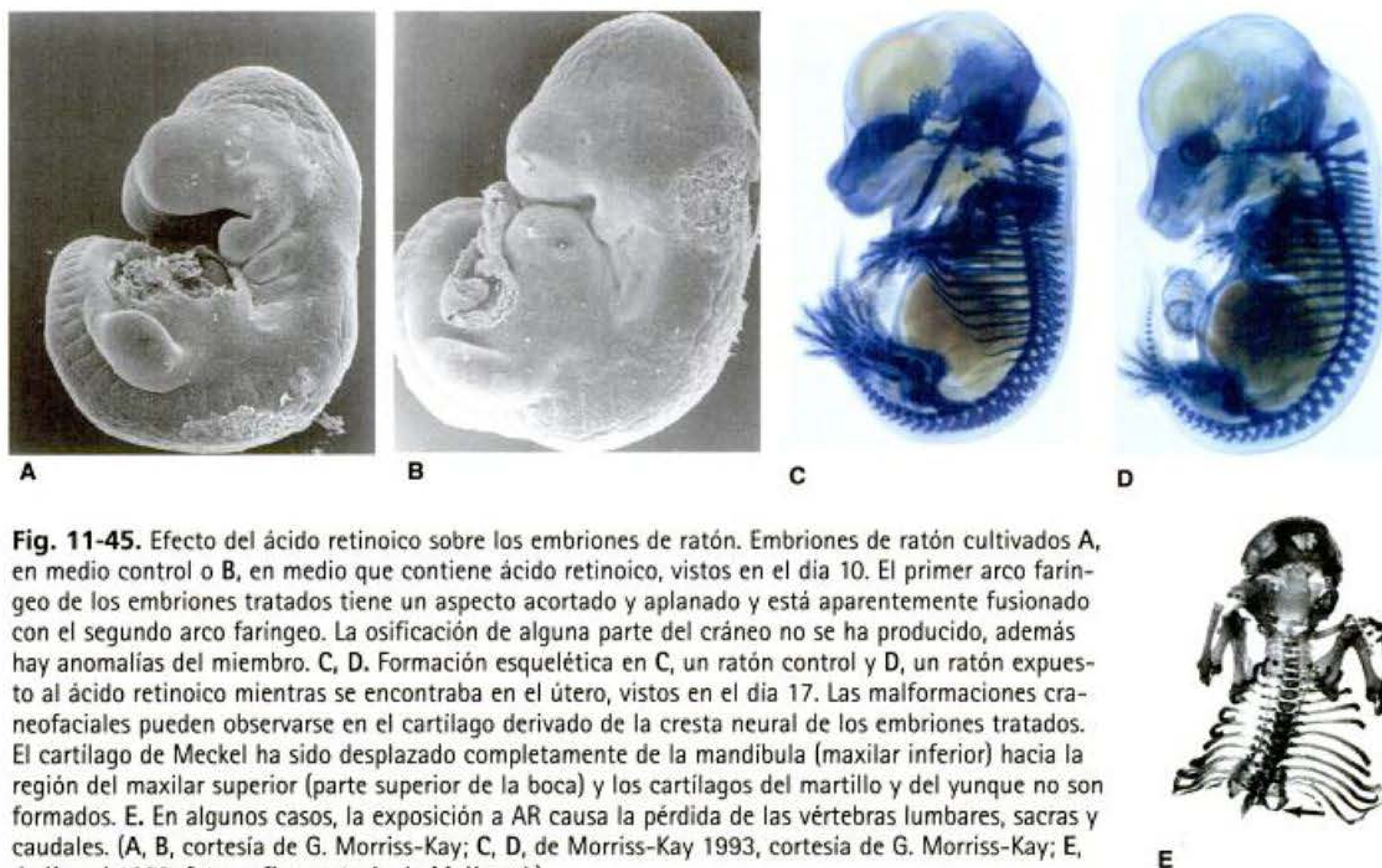


Fig. 11-45. Efecto del ácido retinoico sobre los embriones de ratón. Embriones de ratón cultivados **A**, en medio control o **B**, en medio que contiene ácido retinoico, vistos en el día 10. El primer arco faríngeo de los embriones tratados tiene un aspecto acortado y aplanado y está aparentemente fusionado con el segundo arco faríngeo. La osificación de alguna parte del cráneo no se ha producido, además hay anomalías del miembro. **C, D.** Formación esquelética en **C**, un ratón control y **D**, un ratón expuesto al ácido retinoico mientras se encontraba en el útero, vistos en el día 17. Las malformaciones craneofaciales pueden observarse en el cartílago derivado de la cresta neural de los embriones tratados. El cartílago de Meckel ha sido desplazado completamente de la mandíbula (maxilar inferior) hacia la región del maxilar superior (parte superior de la boca) y los cartílagos del martillo y del yunque no son formados. **E.** En algunos casos, la exposición a AR causa la pérdida de las vértebras lumbares, sacras y caudales. (**A, B**, cortesía de G. Morriss-Kay; **C, D**, de Morriss-Kay 1993, cortesía de G. Morriss-Kay; **E**, de Kessel 1992, fotografías cortesía de M. Kessel.)

ñala hacia un código Hox en el cual diferentes constelaciones de genes Hox, activados por diferentes concentraciones de ácido retinoico, especifican las características regionales a lo largo del eje anteroposterior. Los efectos del ácido retinoico sobre los embriones humanos serán discutidos en el capítulo 21.

> VADE MECUM² **El ácido retinoico como un teratógeno (Retinoic acd as a teratogen).** Véanse los efectos teratogénicos del ácido retinoico sobre el desarrollo del pez cebra. **[Hacer clic sobre Zebrafish]**

ANATOMÍA COMPARADA. Un nuevo tipo de embriología comparada está surgiendo basada en la comparación de los patrones de expresión de genes entre las especies. Gaunt (1994) y Burke y col. (1995) han comparado las vértebras del ratón y del pollo. Aunque el ratón y el pollo tienen un número semejante de vértebras, se distribuyen en ellos de modo diferente. Los ratones (como todos los mamíferos, sean ellos jirafas o ballenas) tienen solamente 7 vértebras cervicales. Éstas son seguidas por 13 vértebras torácicas, 6 vértebras lumbares, 4 vértebras sacras y un número variable (20+) de vértebras caudales (fig. 11-46). El pollo, por otra parte, tiene 14 vértebras cervicales, 7 vértebras torácicas, 12 o 13 (según la raza) vértebras lumbosacras y 5 vértebras coccígeas (fusionadas en la cola). Los investigadores se preguntaron, ¿existe una correlación entre la constelación de expresión de genes Hox y el tipo de vértebra formada (por ej., cervical o torácica) o con la posición relativa de la vértebra (p. ej., número 8 o 9)?

La respuesta es que la constelación de expresión de genes Hox predice el tipo de vértebra formada. En el ratón, la transición entre vértebras cervicales y torácicas está entre las vértebras 7 y 8; en el pollo, estáa entre las vértebras 14 y 15. En ambos casos, los parálogos Hox-5 son expresados en la última vértebra cervical, mientras que el límite anterior de los parálogos Hox-6 se extiende hasta la primera vértebra torácica. Del mismo modo, en ambos animales, la transición tóraco-lumbar es vista en el límite entre los grupos parálogos Hox-9 y Hox-10. Parece que hay un código de expresión de genes Hox diferente a lo largo del eje anteroposterior y que el código determina el tipo de vértebra formada.

> SITIO WEB 11.9 **¿Por qué los mamíferos tienen solo siete vértebras cervicales? (Why do mammals have only seven cervical vertebrae?)** Especulaciones recientes predicen que los genes Hox de mamíferos funcionan simultáneamente en varios procesos. La alteración de la expresión de un gen Hox de modo tal que cambie el tipo vertebral podría llevar a cambios letales en otros procesos.

Los ejes dorsoventral e izquierda-derecha en los ratones

El eje dorsoventral

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos de formación del eje dorsoventral en mamíferos. En ratones y humanos, el hipoblasto se forma sobre el lado de la masa celular interna que está expuesto al líquido del blastocisto, mientras que el eje dorsal se forma a partir de las

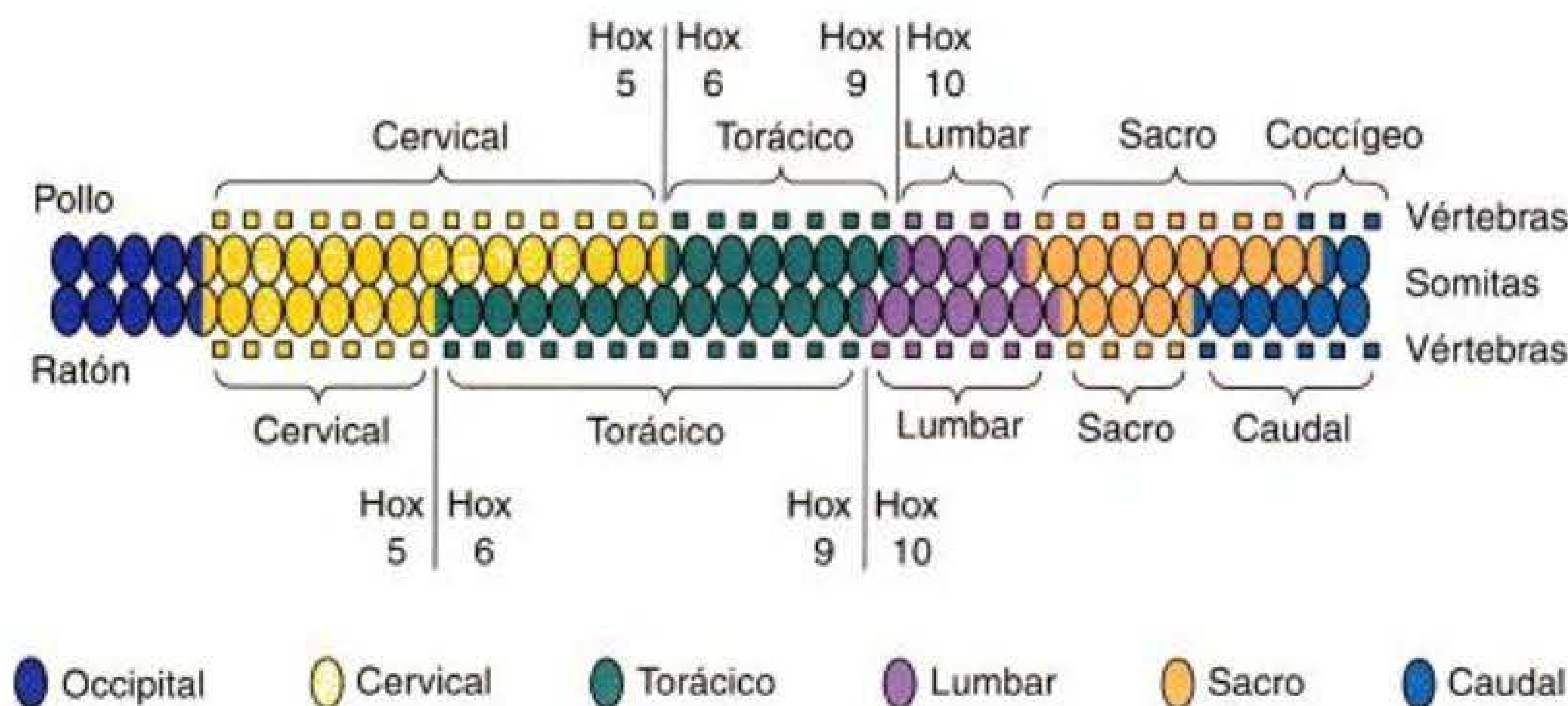


Fig. 11-46. Representación esquemática del patrón vertebral del ratón y del pollo a lo largo del eje anteroposterior. Los límites de expresión de ciertos grupos parálogos de genes Hox han sido mapeados sobre estos dominios. (Según Burke y col. 1995.)

células de la MCI que están en contacto con el trofoblasto. Por lo tanto, el eje dorsoventral del embrión es, en parte, definido por el eje embrionario-abembrionario del blastocisto. La **región embrionaria** contiene a la MCI, mientras que la **región abembrionaria** es la parte del blastocisto opuesta a la MCI. La localización de la masa celular interna (y por lo tanto, del eje embrionario-abembrionario) parece ser especificada por el punto de entrada del espermatozoide. Los experimentos de marcación han demostrado que el primer plano de segmentación define el borde entre las regiones embrionaria y abembrionaria del blastocisto, y que la posición del primer plano de segmentación se correlaciona con la posición de entrada del espermatozoide (fig. 11-47; Gardner 2001; Piotrowska y Zernicka-Goetz 2001; Plusa y col. 2002). Una célula de las primeras dos blastómeras parece ser influida para convertirse en MCI, mientras que la otra parece ser influida para formar las células del trofoblasto. A medida que continúa el desarrollo, la notocorda mantiene la polaridad dorsoventral mediante la inducción de específicos patrones dorsoventrales de expresión de genes en el ectodermo que lo recubre (Goulding y col. 1993). Por lo tanto, "hay una memoria de la primera segmentación en nuestra vida" (M. Zernicka-Goetz, citado en Pearson 2002).

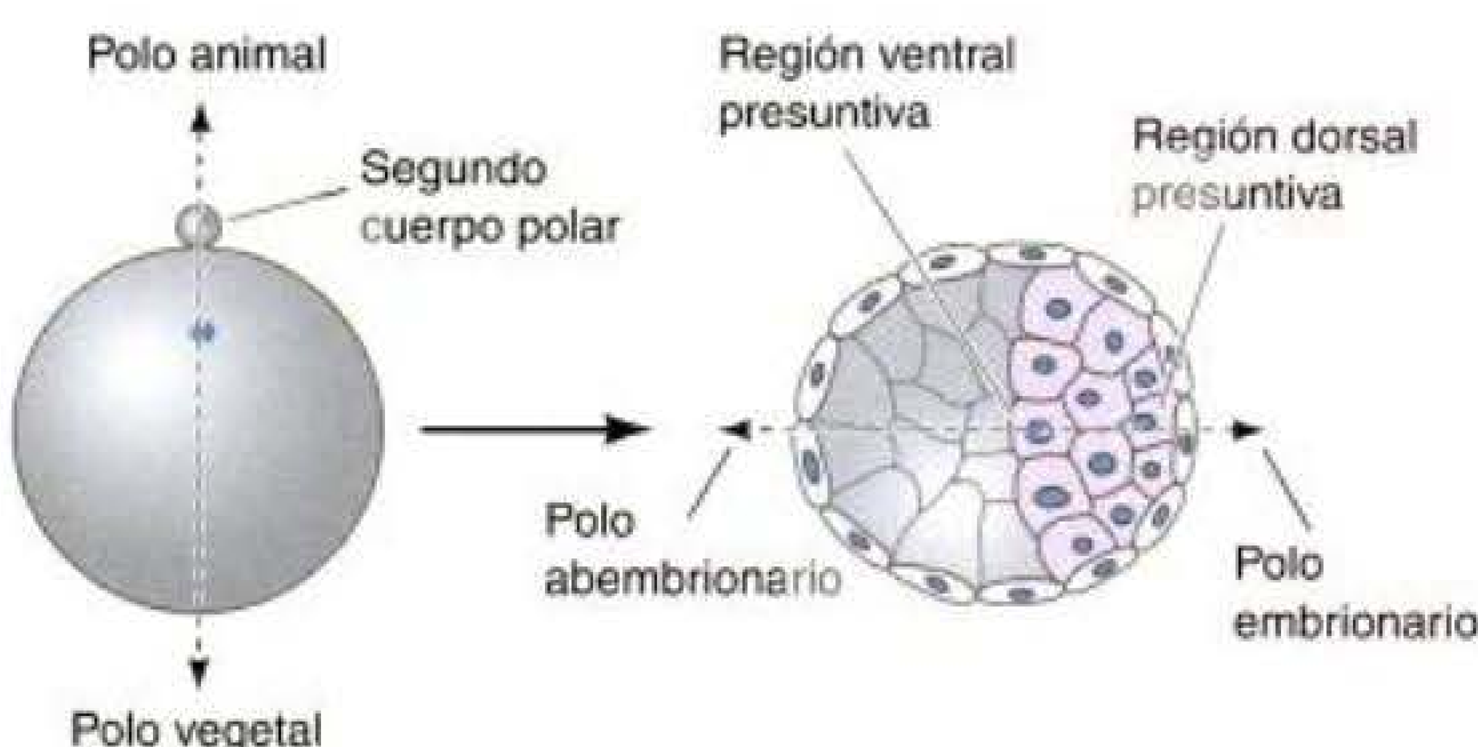


Fig. 11-47. Relación entre el eje animal-vegetal del cigoto y el eje embrionario-abembrionario del blastocisto. El cuerpo polar marca el polo animal del embrión. El eje dorsoventral del embrión parece formarse en ángulo recto al eje animal-vegetal del cigoto.

El eje izquierda-derecha

El cuerpo de los mamíferos no es simétrico. Aunque el corazón humano comienza su formación en la línea media del embrión, se mueve hacia el lado izquierdo del tórax y forma el asa hacia la derecha (fig. 11-48). El bazo es hallado solamente sobre el lado izquierdo del abdomen, el lóbulo principal del hígado se forma sobre el lado derecho del abdomen, las asas del intestino grueso se curvan de derecha a izquierda como si atravesaran la cavidad abdominal y el pulmón derecho tiene un lóbulo más que el pulmón izquierdo.

Las mutaciones en ratones han mostrado que hay dos niveles de regulación del eje izquierda-derecha: un nivel global y un nivel específico de órgano. Las mutaciones del gen *situs inversus viscerum* (*iv*) distribuyen al azar los ejes izquierda-derecha para cada órgano asimétrico independientemente (Hummel y Chapmann 1959; Layton 1976). Esto significa que el corazón puede curvarse hacia la izquierda en un animal homocigota, pero hacia la derecha en otro. Además, la dirección de la formación del asa cardíaca no está coordinada con la localización del bazo o del estómago. Esta falta de coordinación puede causar serios problemas, incluso la muerte. Un segundo gen, *inversion of embryonic turning* (*inv*) (inversión del giro embrionario), causa un fenotipo más global. Los ratones homocigotas para una mutación de inserción en este locus tienen todos sus órganos asimétricos sobre el lado incorrecto del cuerpo (Yokoyama y col. 1993).* Debido a que todos los órganos fueron invertidos, esta asimetría no tiene consecuencias directas para el ratón.

Recientemente se han descubierto varios genes adicionales que se expresan asimétricamente y sus influencias sobre otros han permitido a los científicos organizarlos en una posible vía o ruta. El final de esa vía –la activación de las proteínas Nodal y del factor de transcripción Pitx2 sobre el lado izquierdo de la lámina del mesoder-

* Este gen fue descubierto accidentalmente cuando Yokoyama y col. (1993) hicieron ratones transgénicos en los que el transgén (para la enzima tirosinasa) fue insertado al azar en el genoma. En otros casos, este gen se autoinsertó en una región del cromosoma 4, produciendo el knockout del gen *inv* existente. Los ratones homocigotas resultantes tenían defectos de lateralidad.

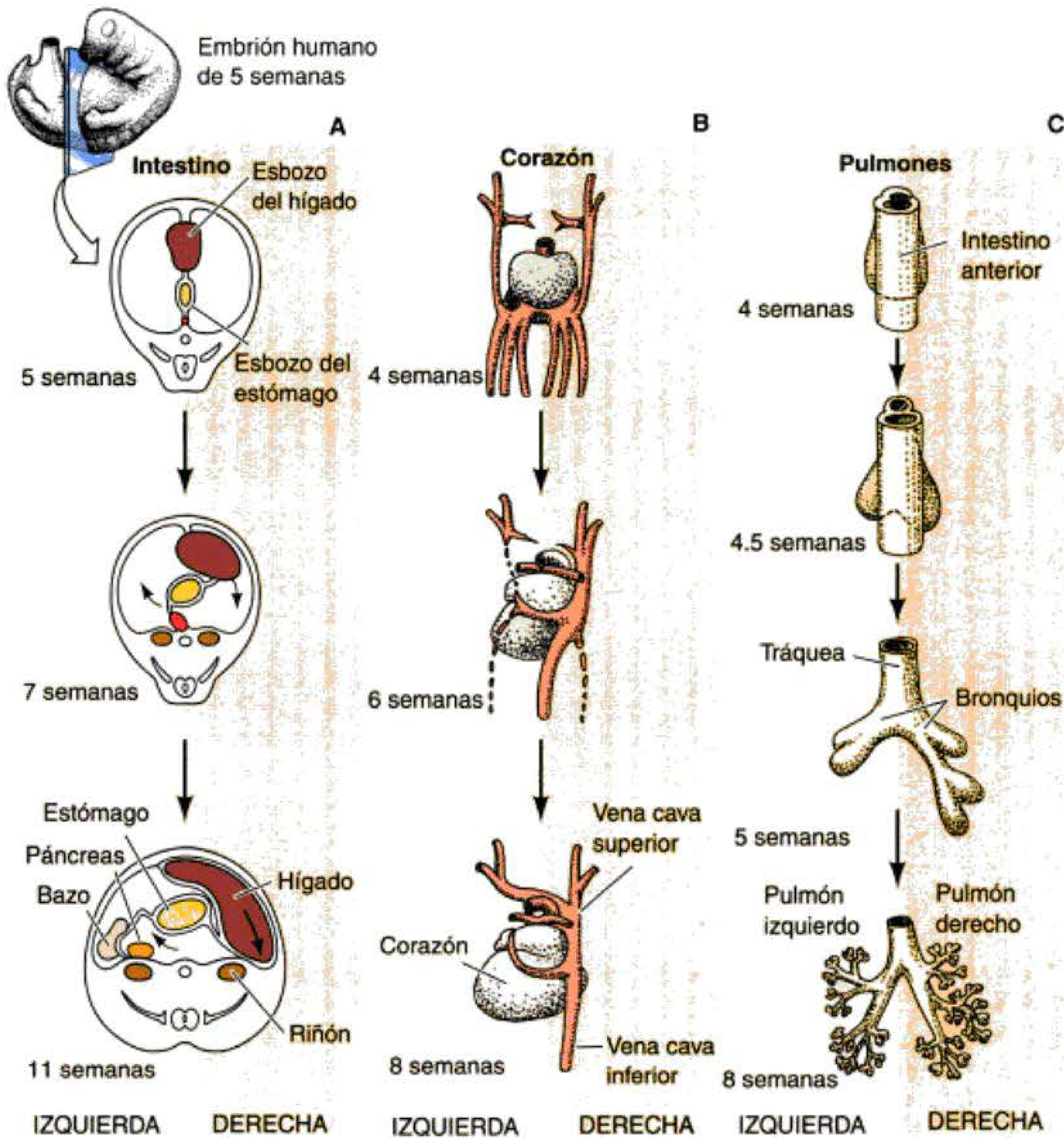
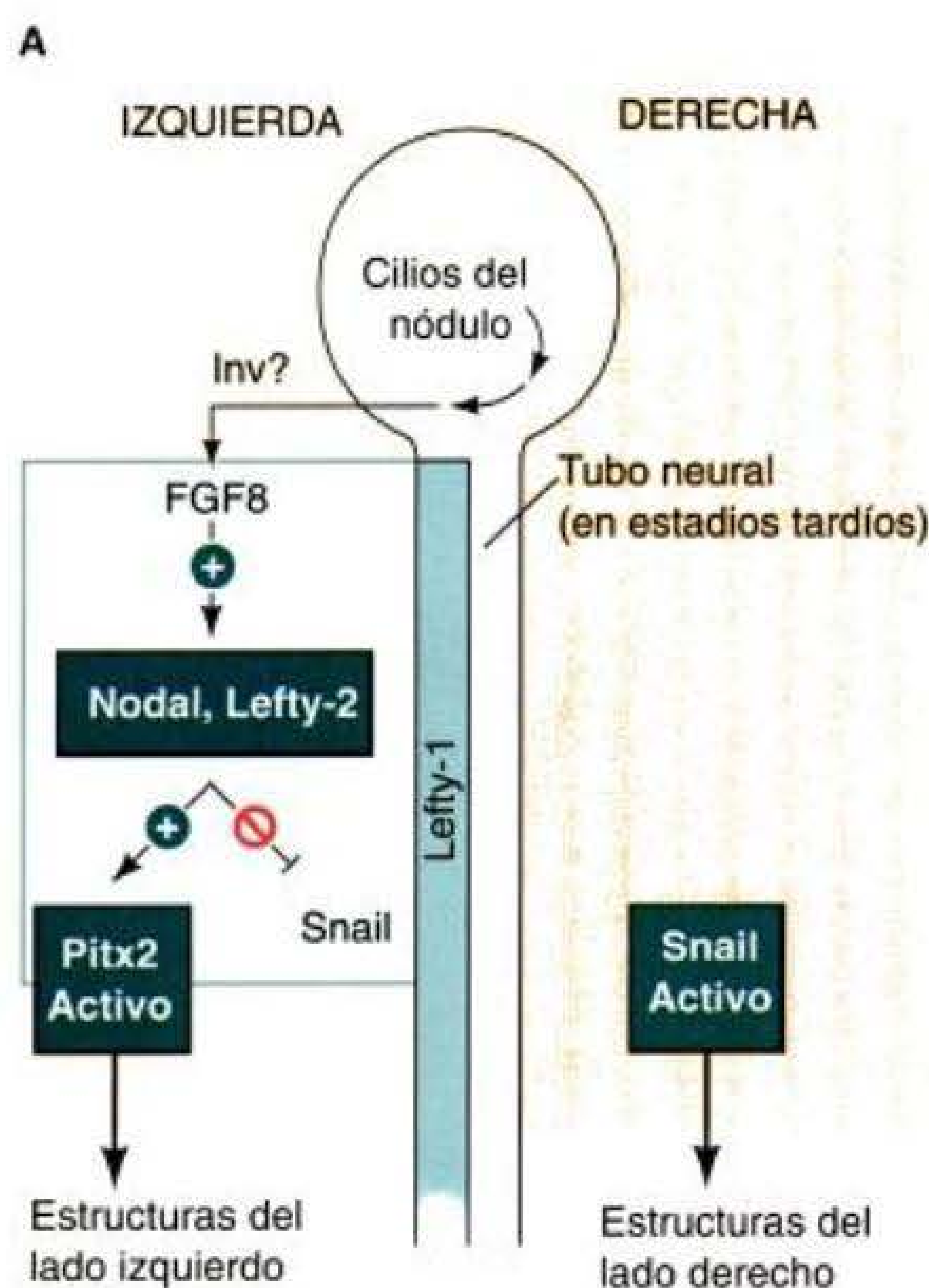


Fig. 11-48. Asimetría izquierda-derecha en el desarrollo humano. **A.** Secciones transversales abdominales que muestran que los esbozos de los órganos originalmente simétricos adquieren posiciones asimétricas hacia la semana 11. El hígado se mueve hacia la derecha y el bazo se mueve hacia la izquierda. **B.** No solo el corazón se mueve hacia el lado izquierdo del cuerpo, sino que las venas del corazón originalmente simétricas experimentan una regresión diferencial para formar las venas cava superior e inferior, que se conectan solamente con el lado derecho del corazón. **C.** El pulmón derecho se ramifica en tres lóbulos, mientras que el pulmón izquierdo (cerca del corazón) forma solo dos lóbulos. En los varones, el escroto también se forma asimétricamente. (Según Kosaki y Casey 1998.)

mo lateral– parece ser el mismo que el de los embriones de rana y de pollo, aunque el camino que conduce a este punto difiere entre las especies (fig. 11-49; véase fig. 11-23; Collignon y col. 1996; Lowe y col. 1996; Meno y col. 1996). En ranas, la vía comienza con la localización de Vg1; en pollos ésta comienza con la supresión de la expresión de *sonic hedgehog*.

En los mamíferos, la distinción entre los lados izquierdo y derecho comienza en las células ciliares del nódulo (fig. 11-49B). Los cilios hacen que el fluido en el nódulo fluya de derecha a izquierda. Cuando Nonaka y colegas (1998) hicieron el knockout del gen que codifica la proteína motora ciliar dineína (véase cap. 7), los cilios del nódulo no se movían y el situs (posición lateral) de cada órgano asimétrico era al azar. Este hallazgo se correlacionaba extremadamente bien con otros datos. En primer lugar, se sabía desde hace mucho tiempo que humanos que tenían un defecto de dineína tenían cilios inmóviles y una posibilidad al azar de tener su corazón sobre el lado izquierdo o derecho del cuerpo (Afzelius 1976). En segundo lugar, cuando el gen *iv* descrito anteriormente fue clonado, se halló que codificaba la proteína ciliar dineína (Supp y col. 1997). En tercer lugar, cuando Nonaka y colegas (2002) cultivaron a embriones tempranos de ratón bajo un flujo artificial de medio de izquierda a derecha, obtuvieron una inversión del eje izquierda-derecha. Además, el flujo fue capaz de dirigir la polaridad del eje izquierda-derecha en los ratones mutantes *iv*, cuyos cilios eran de otro modo inmóviles.*

* Un informe reciente (Essner y col. 2002) sugiere que los cilios del nódulo pueden ser responsables de la formación del eje izquierda-derecha en todas las clases de vertebrados. Cuando el gen para la subunidad de la dineína fue clonado, se halló que era expresado en la porción ventral del nódulo (u organizador) en los embriones de ratón, de pollo, de *Xenopus* y de pez cebra.



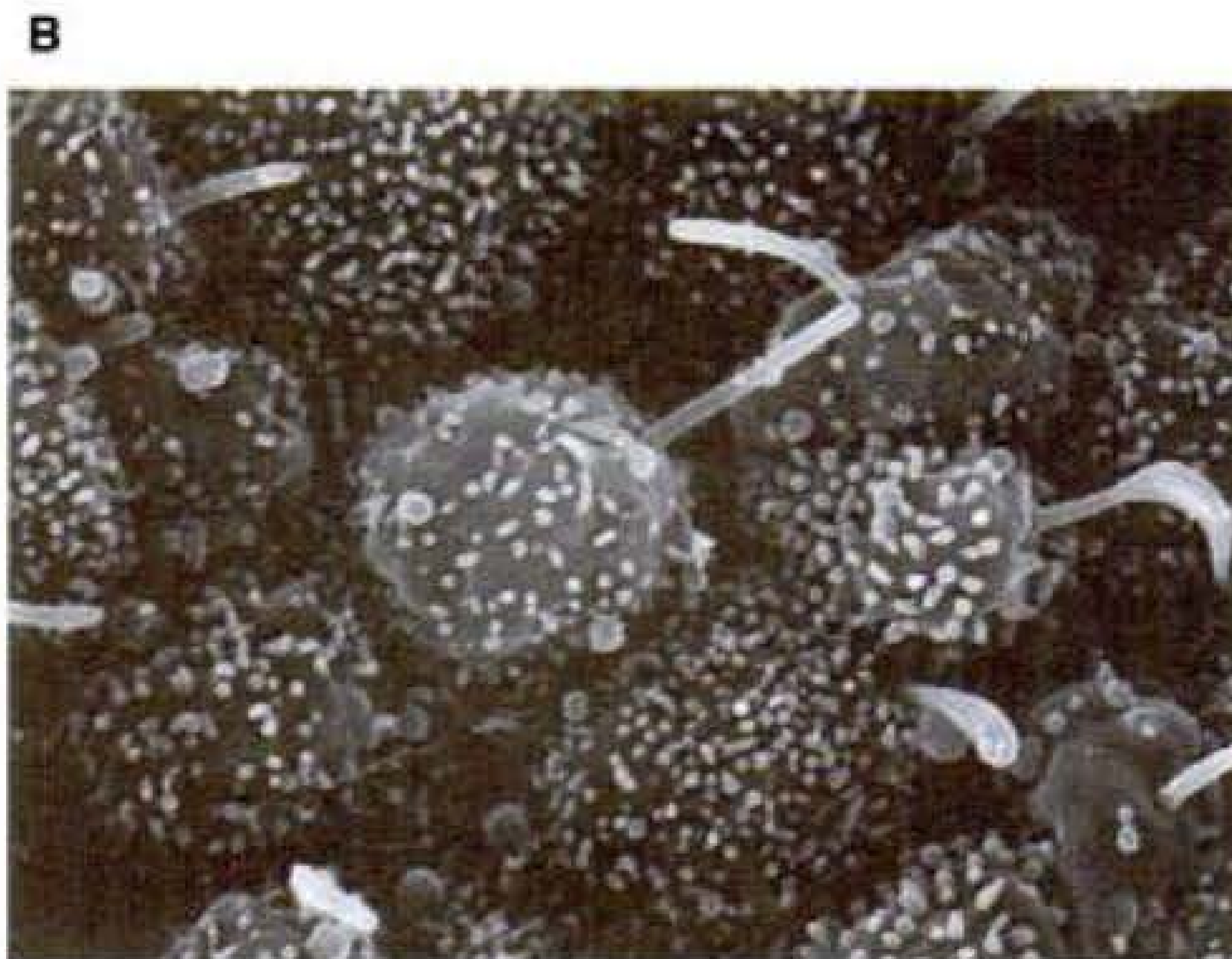


Fig. 11-49. Formación del situs en los mamíferos. **A.** Vía propuesta para la formación del eje izquierda-derecha en el ratón. El movimiento hacia la izquierda de los cilios en el nódulo activa algunos factores todavía no identificados (posiblemente el producto del gen *inv*). Este producto activa a los genes *nodal* y *lefty-2*. La difusión de las proteínas Nodal y Lefty-2 hacia el lado derecho está restringida por el producto del gen *lefty-1*, que cubre la parte inferior del tubo neural sobre el lado izquierdo. Nodal activa a *pitx2*, el gen cuyo producto activa las propiedades del lado izquierdo en varios órganos que lo contienen. Las señales de Nodal o de Lefty-2 (quizás ambas) reprimen al gen *snail*, cuyo producto es necesario para instruir al lado derecho. **B.** Células ciliadas del nódulo de mamíferos. Esta microfotografía es una imagen de cerca del nódulo visto en la figura 11-34A. (Microfotografía cortesía de K. Sulik y G. C. Shoenwolf.)

De algún modo (quizá mediado a través del producto del gen *rotatin*, que codifica una proteína que es esencial para la expresión de *nodal*, *lefty2* y *pitx2*), el movimiento de los cilios hacia la izquierda activa la vía corriente abajo (Faisst y col. 2002). Una posibilidad es que este movimiento de los cilios hacia la izquierda activa al gen *fgf8*. La señal de FGF8 podría entonces activar a los genes para dos factores paracrinos, Nodal y Lefty-2, en la lámina del mesodermo lateral sobre el lado izquierdo del embrión (fig. 11-49A). Las proteínas producidas por estos factores se diseminan a lo largo del lado izquierdo del embrión y parecen ser contenidas sobre este lado por la proteína Lefty-1, que es secretada por la parte inferior del lado izquierdo del tubo neural (Meno y col. 1998). Lefty-2 parece ser capaz de bloquear a la proteína Snail (que llega a ser específica para el lado derecho del cuerpo), mientras que Nodal activa la expresión del gen *pitx2* (Pedra y col. 1998). Por lo tanto, los genes para la formación del eje derecha-izquierda parecen ser similares a lo largo de los vertebrados, pero en algunos casos son utilizados de modo diferente. Una de las grandes diferencias es que Fgf8 ayuda a especificar el lado derecho de los pollos y el lado izquierdo de los mamíferos (Meyers y Martin 1999).

Los estudios de desarrollo en los mamíferos tienen una enorme importancia para el entendimiento de numerosas enfermedades humanas. En los siguientes capítulos, se verán aspectos tardíos del desarrollo de los vertebrados y las relaciones entre la genética y el desarrollo durante la formación de los órganos.

Resumen: desarrollo temprano en los vertebrados

1. Peces, reptiles y aves experimentan una segmentación meroblástica discoidal, en donde las divisiones celulares tempranas no cortan a través del vitelo del cigoto. Estas células tempranas forman un blastodermo.
2. En el pez, las células profundas del blastodermo se forman entre la capa sincitial de vitelo y la capa de la envoltura. Estas células migran por encima del vitelo y forman las capas del hipoblasto y del epiblasto. Sobre el futuro lado dorsal, estas capas se intercalan para formar el escudo embrionario, una estructura homóloga al organizador de los anfibios. Trasplantes del escudo embrionario hacia el lado ventral de otro embrión causarán la formación de un segundo eje embrionario.
3. En cada una de las clases de vertebrados, se permite la formación de ectodermo neural donde se evita la inducción de tejido epidérmico mediada por BMP.
4. En los embriones de pollo, la segmentación temprana forma un área opaca y un área pelúcida. La región entre ellas es la zona marginal. La gastrulación comienza en la zona marginal posterior, a medida que empiezan allí el hipoblasto y la línea primitiva.
5. La línea primitiva es derivada de las células epiblásticas anteriores y de las células centrales de la zona marginal posterior. A medida que la línea primitiva se extiende rostralmente, se forma el nódulo de Hensen. Las células que migran a través del nódulo de Hensen se convierten en las células del cordameso-

dermo (notocorda). Estas células se extienden hasta el cerebro medio presuntivo, donde se encuentran con la placa precordal.

6. La placa precordal induce la formación del cerebro anterior; el cordamesodermo induce la formación del cerebro medio, del cerebro posterior (rombencéfalo) y de la médula espinal. Las primeras células migran lateralmente a través de la línea primitiva convirtiéndose en endodermo, desplazando al hipoblasto. Las células del mesodermo luego migran a través de la línea primitiva. Mientras tanto, el ectodermo superficial experimenta epibolia alrededor de la totalidad del vitelo.
7. En aves, la gravedad es crítica en la determinación del eje anteroposterior, mientras que las diferencias de pH parecen ser cruciales para distinguir dorsal de ventral. El eje izquierda-derecha es formado por la expresión de la proteína Nodal sobre el lado izquierdo del embrión, que señaliza la expresión de Pitx2 sobre el lado izquierdo de los órganos.
8. Los mamíferos experimentan segmentación holoblástica rotacional, caracterizada por baja velocidad de división celular, orientación de segmentación única, carencia de sincronía y formación de un blastocisto.
9. El blastocisto se forma después de que las blastómeras experimentan compactación. Contiene células externas –las células del trofoblasto– que se convierten en el corion y una masa celular interna que se convierte en el amnios y el embrión.
10. El corion forma la porción fetal de la placenta, cuyas funciones proporcionan oxígeno y nutrientes al embrión, hormonas para el mantenimiento del embarazo y barreras para el sistema inmune de la madre.
11. La gastrulación en los mamíferos no es diferente de la de las aves. Parece haber dos centros señalizadores, uno en el nódulo y otro en el endodermo visceral anterior. Este último centro es crítico para la generación del cerebro anterior, mientras que el primero es crítico en la inducción de las estructuras axiales caudalmente al cerebro medio.
12. Los genes Hox establecen el patrón del eje anteroposterior y ayudan a especificar posiciones a lo largo de este eje. Si se hacen knockouts de los genes Hox, se originan malformaciones específicas de segmentos. Del mismo modo, cuando se provoca la expresión ectópica de los genes Hox se puede alterar el eje del cuerpo.
13. La homología de la estructura del gen y las semejanzas de los patrones de expresión entre los genes Hox de *Drosophila* y de mamíferos sugiere que este mecanismo de establecimiento de patrón es extremadamente antiguo.
14. El eje izquierda-derecha de los mamíferos es especificado del mismo modo que el del pollo, pero con algunas diferencias significativas en los papeles de ciertos genes.

Bibliografía citada

Afzelius, B. A. 1976. A human syndrome caused by immotiie ciiia. Science 193: 317-319.

Alvarez, I. S., M. Araujo and M. A. Nieto. 1998. Neural induction in whole embryo cultures by FGF. Dev. Biol. 199: 42-54.

Arendt, D. and K. Nubler-Jung. 1999. Rearranging gastrulation in the name of yolk: Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. Mech. Dev. 81:3-22.

Bachiller, D. and 10 others. 2000. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. Nature 403: 658-661.

Bachvarova, R. F., I. Skromne and C. D. Stern. 1998. Induction of primitive streak and Hensen's node by the posterior marginal zone in the early chick embryo. Development 125: 3521-3534.

Balinsky, B. I. 1975. Introduction to Embryology 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Balling, R., G. Mutter, P. Gruss and M. Kessel. 1989. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice. cen 58: 337-347.

Barlow, P., D. A. J. Owen and C. Graham. 1972. DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 27: 432-445.

Beams, H. W. and R. G. Kessel. 1976. Cytokineses: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells. Am. Sci 64: 279-290.

Beddington, R. S. P. 1994. Induction of a second neural axis by the mouse node. Development 120: 613-620.

Beddington, R. S. P. and E. J. Robertson. 1999. Axis development and early asymmetry in mammals. cen 96: 195-209.

Beliairs, R. 1986. The primitive streak. Anat. Embryol. 174: 1-14.

Bellairs, R., A. S. Breathnach and M. Gross.1975. Freeze-fracture replication of junctional complexes in unincubated and incubated chick embryos. Cell Tisse Res. 162: 235-252.

Bellairs, R., F. W. Lorenz and T. Dunlap. 1978. Cleavage in the chick embryo. J. Embryol. Exp. MorphoL 43: 55-69.

Benson, G. V., H. Lim, B. C. Paria, I. Satokata, S K. Dey and R. L. Maas. 1996. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: Uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. Development 122: 2687-2696.

Bertocchini, F. and C. D. Stern. 2002. The hypoblast of the chick embryo positions the primitive streak by antagonizing Nodal signaling. Dev. Cell 3: 735-744.

Bianchi, D. W., L. E. Wilkins-Haug, A. C. Enders and E. D. Hay . 1993. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: Relevance to chorionic mosaicism in humans. Am. J. Med Genet. 46: 542-550.

Blader, P. and U. Strahle 1998. Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. Dev. Biol. 201: 185-201.

Boettger, T., H. Knoetgen, L. Wittler and M. Kessel. 2001. The avian organizer. Int. J. Dev. Biol. 45: 281-287.

Boncinelli, E., R. Somma, D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Faiella and A. Simeone. 1988. Organization of human homeobox genes. Hum. Reprod. 3: 880-886.

Borland, R. M. 1977. Transport processes in the mammaiian blastocyst. Dev. Mammals 1: 31-67.

Brennan, J., C. C. Lu, D. P. Norris, T. A. Rodriguez, R. S. Beddington and E. J. Robertson. 2001. Nodal signalling in the epiblast patterns he early mouse embryo. Nature 411: 965-969.

Brenner, C. A., R. R. Adler, D. A. Rappolee, R. A. Pedersen and Z. Werb. 1989. Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. Genes Dev. 3: 848-859.

Burdsal, C. A., C. H. Damsky and R. A. Pedersen. 1993. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. Development 118: 829-844.

Burke, A. C., A. C. Nelson, B. A. Morgan and C. Tabin.1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. Development 121: 333-346.

Carson, D. D., J.-P. Tang and J. Julian. 1993. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. Dev. Biol. 155: 97-106.

Chisaka, O. and M. Capecchi. 1991. Regionally restricted developnental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox- 1.5. Nature 350: 473-479.

Ciruna, B. and J. Rossant. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. Dev. Cell 1: 37-49.

Collignon, J., I. Varlet and E. J. Robertson. 1996. Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. Nature 381: 155-158.

Condie, B. G. and M. R. Capecchi. 1994. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes hoxa-3 and hoxd-3 reveal synergistic interactions. Nature 370: 304-307.

Conlon, R. A. and J. Rossant. 1992. Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic exptession of murine Hox-2 genes in vivo. Development 116: 357-368.

Cruz, Y. P. and R. A. Pedersen. 1991. Origin of embryonic and extraembryonic celi lineages in mammalian embryos. In Animal Applications of Research in Mammalian Development. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 147-204.

Darnell, D. K., M. R. Stark and G. C. Schoenwolf 1999. Timing and cell interactions underlying neural induction in the chick embryo. Development 126: 2505-2514.

de la Chappelle, A., J. Schroder, P. Rantanen, B. Thomasson, M. Niemi, A. Tiiikainen, R. Sanger and E. E. Robson. 1974. Early fusion of two human embryos? Ann. Hum. Genet. 38: 63-75.

DeLuca, S. M. and 7 others. 1999. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes a switch from E- to N-cadherin in chick embryo epiblast cells. Exp. Cell. Res. 251: 3-15.

Dias, M. S. and G. C. Schoenwolf. 1990. Formation of ectopic neuroepithelium in chick blastoderms: Age-related capacities for induction and self-differentiation following transplantation of quail Hensen's nodes. Anat. Rec. 229: 437-448.

Driever, W. 1995. Axis formation in zebrafish. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 610-618.

Driever, W. and 11 others. 1996. A genetic screen for mutations affecting development in zebrafish. Development 123: 37-46.

Du, S. J. and M. Dienhart.2001. Zebrafish Tiggy-winkle hedgehog promoter directs notochord and floorplate green fluorescence protein expression in transgenic zebrafish embryos. Dev. Dynam. 222: 655-666.

Dyce, J., M. George, H. Goodall and T. P. Fleming. 1987. Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? Development 100: 685-698.

Episkopou, V., R. Arkell, P. M. Timmons, J. J. Walsh, R. L. Andrew and D. Swan. 2001. Induction of the mammalian node requires Arkadia function in the extraembryonic lineages. Nature 410: 825-830.

Ernest, S., G. J. Rauch, P. Haffter, R. Geisler, C. Petit and T. Nicolson. 2000. Mariner is defective in myosin VIIA: A zebrafish model for human hereditary deamess. Hum. Mol. Genet. 9: 2189-2196.

Essner, J. J., K. J. Vogan, M. K. Wagner, C. J. Tabin, H. J. Yost and M. Brueckner. 2002. Conserved function for embryonic nodal cilia. Nature 418: 37-38.

Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 292: 154-156.

Eyal-Giladi, H.1991. The early embryonic development of the chick, an epigenetic process. Crit. Rev. Poultry Biol. 3: 143-166.

Eyal-Giladi, H. 1997. Establishment of the axis in chordates: Facts and speculations. Development 124:2285-2296.

Eyal-Giladi, H. and B. Fabian. 1980. Axis determination in uterine chick blastocysts under changing spatial positions during the sensitive period of polarity. Dev. Biol. 77: 228-232.

Eyal-Giladi, H., A. Debby and N. Harel. 1992. The posterior section of the chick's area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. Development 116: 819-830.

Faisst, A. M., G. Alvarez-Bolado, D. Treichel and P. Gruss. 2002. Rotatin is a novel gene required for axial rotation and left-right specification in mouseembryos. Mech. Dev. 113: 15-28.

Faure, S., P. de Santa Barbara, D. J. Roberts and M. Whitman. 2002. Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. Dev. Biol. 244: 44-65.

Fekany, K. and 14 others.1999. The zebrafish bozozok locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. Development 126: 1427-1438.

Fisher, S. J., T.-Y. Cui, L. Zhang, K. Grahl, Z. GuoYang, J. Tarpey and C. H. Damsky. 1989. Adhesive and degradative properties of the human placental cytotrophoblast cells in vitro. J. Cell Biol. 109: 891-902.

Fleming, T. P. 1987. Quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. Dev. Biol. 119: 520-531.

Fleming, T. P., B. Sheth and I Fesenko. 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. Front. Biosci. 6: 1000-1007.

Fluck, R. A., K. L. Krok, B. A. Bast, S. E. Michaud and C. E. Kim. 1998. Gravity influences the position of the dorsoventral axis in medaka fish embryos (Oryzias latipes). Dev. Growth Di 40: 509-518.

Foley, A. C., I. Skromne and C. D. Stern. 2000. Reconciling different models of forebrain induction and patterning: A dual role for the hypoblast. Development 127: 3839-3854.

Fu, M.-F., C. Pressman, R. Dyer, R. L.

lopment 125: 1957-1966.
Krumlauf, R. 1993. Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. Trends Genet. 9: 106-112.

Langeland, J. and C. B. Kimmel. 1997. The embryology of fish. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 383-407.

Langman, J. 1981. Medical Embryology, 4th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Larsen, W. J. 1993. Human Embryology. Churchill Livingston, New York.

Lash, J. W., E. Gosfield III, D. Ostrovsky and R. Bellairs. 1990. Migration of chick blastoderm under the vitelline membrane: The role of fibronectin. Dev. Biol. 139: 407-416.

Lawson, A. and G. C. Schoenwolf. 2001a. New insights into critical events of avian gastrulation. Anat. Rec. 262: 238-252.

Lawson, A. and G. C. Schoenwolf. 2001b. Cell populations and morphogenetic movements underlying formation of the avian primitive streak. genesis 29: 188-195.

Lawson, A., J.-F. Colas and G. C. Schoenwolf. 2001. Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the anterior primitive streak. Anat. Rec. 262: 221-226.

Lawson, K. A., J. J. Meneses and R. A. Pedersen. 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. Development 113: 891-911.

Layton, W. M., Jr. 1976. Random determination of a developmental process. J. Hered. 67: 336-338.

Le Douarin, N., A. Grapin-Botton and M. Catala. 1996. Patterning of the neural primordium in the avian embryo. Semin. Dev. Biol. 7: 157-167.

Le Mouellic, H., Y. Lallemand and P. Brûlet. 1992. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3. I gene. Cell 69: 251-264.

Leung, C., S. E. Webb and A. Miller. 1998. Calcium transients accompany ooplasmic segregation in zebrafish embryos. Dev. Growth Diff: 40: 313-326.

Leung, C., S. E. Webb and A. Miller.2000. On the mechanism of ooplasmic segregation in single-cell zebrafish embryos. Dev. Growth Di: 42: 29-40.

Levin, M., R. L. Johnson, C. Stern, M. Kuehn and C. Tabin. 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. Cell 82: 803-814.

Levin, M., S. Pagan, D. Roberts, J. Cooke, M. R. Kuehn and C. I- Tabin. 1997. Left/Right patterning signals and the independem regulation of different aspects of situs in the chick embryo. Dev. Biol. 189: 577.

Levken, A. C., C. J. Thorpe, T. S. Waxman and R. T. Moon. 2001. Zebrafish wnt8 encodes two Wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. Dev. Cell 1: 103-114.

Lin, C. R. and 7 others.1999. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning, and pituitary and tooth morphogenesis. Nature 401: 279-282.

Logan, M., S. M. Pagán-Westphal, D. M. Smith, L. Paganessi and C. J. Tabin. 1998. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. Cell 94: 307-317.

Lowe, L. A. and 8 others. 1996. Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. Nature 381: 158-161.

Luckett, W. P.1978. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. Am. J. Anat. 152: 59-98.

Manlq, N. R. and M. R. Capecchi.1995. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. Development 121: 1989-2003.

Mark, W. H., K. Signorelli and E. Lacy. 1985. An inserted mutation in a transgenic mouse line results in developmental arrest at day 5 of gestation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 50: 453-463.

Markert, C. L. and R. M. Petters. 1978. Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells. Science 202: 56-58.

Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. NatL Acad. Sci. USA 78: 7634-7638.

Mayr, W. R., V. Pausch and W. Schnedl. 1979. Human chimaera detectable only by investigation of her progeny. Nature 277: 210-211.

McGinnis, W. and R. Krumlauf 1992. Homeobox genes and axial patterning. Cell 68: 283-302.

Meno, C. and 7 others. 1996. Left-right asymmetric expression of the TGF-family member lefty in mouse embryos. Nature 381: 151-155.

Meno, C. and 8 others. 1998. lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. Cell 94: 287-297.

Meyers, E. N. and G. R. Martin. 1999. Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: Functions of FGF8 and SHH. Science 285: 403-406.

Mitrani, E., T. Ziv, G. Thomsen, Y. Shimoni, D. A. Melton and A. Bril. 1990. Activin can induce the formation of axial structures and is expressed in the hypoblast of the chick. Cell 63: 495-501.

Morriss-Kay, G. 1993. Retinoic acid and craniofacial development: Molecules and morphogenesis. BioEssays 15: 9-15.

Mulnard, J. G. 1967. Analyse microcinematographique du developpement de l'oeuf de souris du stade 11 au blastoqste. Arch. Biol. (Liege) 78: 107-138.

New, D. A. T. 1956. The formation of subblastodermic fluid in hens' eggs. J. Embryol. Exp. Morphol. 43: 221-227.

New, D. A. T. 1959. Adhesive properties and expansion of the chick blastoderm. J. Embryol. Exp. Morphol. 7: 146-164.

Nguyen, V. H., B. Schmid, J. Trout, S. A. Connors, M. Ekker and M. C. Mullins. 1998. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a bmp2b/swirl pathway of genes. Dev. Biol. 199: 93-110.

Nonaka, S. and 7 others. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. Cell 95: 829-837.

Nonaka, S., H. Shiratori, Y. Saijoh and H. Hamada. 2002. Determination of left-right pat-
terning in the mouse by artificial nodal flow. Nature 418: 96-99.

Oppenheimer, J. M. 1936. Transplantation experiments on developing teleosts (Fundulus and Perca). J. Exp. Zool. 72: 409-437.

O'Sullivan, C. M., S. L. Rancourt, S. Y. Liu and D. E. Rancourt. 2001. A novel murine tryptase involved in blastoqst hatching and outgrowth. Reproduction 122: 61-71.

Pearson, H. 2002. Your destiny, from day one. Nature 418: 14-15.

Pedersen, R. A., K. Wu and H. Batakier. 1986. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: Cell lineage analysis by microinjection. Dev. Biol. 117:581-595.

Pedra, M. E., J. M. Icardo, M. Albajar, J. C. Rodriguez-Rey and M. A. Ros. 1998. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. Cell 94: 319-324.

Perea-Gomez, A., M. Rhinn and S.-L. Ang. 2001 Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. Int. J. Dev. Biol. 45: 311-320.

Perona, R. M. and P. M. Wassarman. 1986. Mouse blastoqsts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. Dev. Biol. 114: 42-52.

Peyrieras, N., F. Hyafil, D. Louvard, H. L. Ploegh, and F. Jacob. 1983. Uvomorulin: a non-integral membrane protein of early mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6274-6277.

Piko, L. and K. B. Clegg. 1982. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. Dev. Biol. 89: 362-378.

Piotrowska, K. and M. Zernicka-Goetz. 2001. Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. Nature 409: 517-521.

Plusa, B., K. Piotowska, and M. Zernicka-Goetz. 2002. Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. genesis 32: 193-198.

Prather, R. S.1989. Nuclear transfer in mammals and amphibia. In H. Schatten and G. Schatten (eds.), The Molecular Biology of Fertilization. Academic Press, New York, pp. 323-340.

Psychoyos, D. and C. D. Stern. 1996. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. Development 122: 1523-1534.

Reiter, J. F., Y. Kikuchi and D. Y. R. Stanier. 2001. Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation. Development 128: 125-135.

Renfree, M. B. 1982. Implantation and placentation. In C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Embryonic and Fetal Development. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 26-69.

Rijli, F. M., M. Mark, S. Lakkaraju, A. Dierich, P. Dollé and P. Chambon. 1993. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. Cell 75: 1333-1349.

Rodriguez-Esteban, C., J. Capdevilla, A. N. Economides, J. Pascual, A. Ortiz and J. C. Izpisúa-Belmonte.1999. The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. Nature 401: 243-251.

Rosenquist, G. C. 1966. A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm: Development from primitive-streak stages to stage 12. Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol. 38: 31-110.

Rosenquist, G. C.1972. Endoderm movements in the chick embryo between the short streak and head process stages. J. Exp. Zool. 180: 95-104

Rugh, R.1967. The Mouse. Burgess, Minneapolis.

Russ, A. P. and 11 others.2000. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. Nature 404: 95-99.

Ryan, A. K. and 14 others. 1998. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. Nature 394: 545-551.

Sakai, Y., C. Meno, H. Fujii, J. Nishino, H. Shiratori, Y. Saijoh, J. Rossant and H. Hamada. 2001. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterio-posterior axis within the mouse embryo. Genes Dev. 15: 213-225.

Sampath, K. and 8 others. 1998. Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. Nature 375: 185-189.

Schier, A. F. 2001. Axis formation and patterning in zebrafish. Curr. Opin. Genet. Dev. 11: 393-404.

Schier, A. F. and W. S. Talbot. 1998. The zebrafish organizer. Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 464-471.

Schier, A. F. and W. S. Talbot. 2001. Nodal signaling and the zebrafish organizer. Int. J. Dev. Biol. 45: 289-297.

Schier, A. F., S. C. Neuhauss, K. A. Held, W. S. Talbot and W. Driever. 1997 The one eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. Development 124: 327-342.

Schlesinger, A. B. 1958. The structural significance of the avian yolk in embryogenesis. J. Exp. Zool. 138: 223-258.

Schmitz, B. and J. A. Campos-Ortega. 1994. Dorso-ventral polarity of the zebrafish embryo is distinguishable prior to the onset of gastrulation. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 203: 374-380.

Schneider, S., H. Steinbeisser, R. M. Warga and P. Hausen. 1996. β-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. Mech. Dev. 57: 191-198.

Schoenwolf, G. C. 1991. Cell movements in the epiblast during gastrulation and neurulation in avian embryos. In R. Keller. W. H. Clark, Jr. and F. Griffin (eds.), Castrulation: Movements, Patterns, and Molecules. Plenum, New York, pp.1-28.

Schoenwolf, G. C., V. Garcia-Martinez and M. S. Diaz. 1992. Mesoderm movement and fate during amphibian gastrulation and neurulation. Dev. Dynam. 193: 235-248.

Schulte-Merker, S., K. J. Lee, A. P. McMahon and M. Hammerschmidt. 1997. The zebrafish organizer requires chordino. Nature 387: 862-863.

Scott, M. 1992. Vertebrate homeobox gene nomenclature. Cell 71: 551-553.

Seidel, F. 1952. Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Saugetierei. Naturvissenschaften 39: 355-356.

Shinya, M., M. Furutani-Seiki, A. Kuroiwa and H. Takeda. 1999. Mosaic analysis with oep mutant reveals a repressive interaction between floor-plate and nonfloor-plate mutant cells in the zebrafish neural tube. Dev. Growth Di 41:135-142.

Shook, D. R., C. Majer and R. Keller. 2002. Urodeles remove mesoderm from the superficial layer by subduction through a bilateral primitive streak. Dev. Biol. 248: 220-239.

Skromne, I. and C. D. Stern.2002. A hierarchy of gene expression accompanying induction of the primitive streak by Vgl in the chick embryo. Mech. Dev. 114: 115-118.

Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf 1998. Getting organized: New insights into the organizer of higher vertebrates. Curr. Top. Dev. Biol. 40: 79-110.

Solnica-Krezel, L. and W. Driever. 1994. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: Organization and function during epiboly. Development 120. 2443-2455.

Solnica-Krezel, L. and W. Driever. 2001. The role of the homeodomain protein Bozozok in zebra-fish axis formation. Int. J. Dev. Biol. 45: 299-310.

Solursh, M. and G. M. Morriss. 1977. Glycosaminoglycan synthesis in rat embryos during the formation of the primary mesenchyme and neural folds. Dev. Biol. 57: 75-86.

Solursh, M. and J. P. Revel. 1978. A scanning electron microscope study of cell shape and cell appendages in the primitive streak region of the rat and chick embryo. Differentiation 11: 185- 190.

Spemann, H. and H. Mangold. 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafmer, New York, pp. 144-184.

Spratt, N. T., Jr.1946. Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. J. Exp. Zool. 103: 259-304.

Spratt, N. T., Jr. 1947. Regression and shortening of the primitive streak in the explanted chick blastoderm. J. Exp. Zool. 104: 69-100.

Spratt, N. T., Jr. 1963. Role of the substratum, supracellular continuity, and differential growth in morphogenetic cell movements. Dev. Biol. 7: 51-63.

Spratt, N. T., Jr. and H. Haas. 1960. Integrative mechanisms in development of early chick blastoderm. I. Regulated potentiality of separate parts. J. Exp. Zool. 145: 97-138.

Stern, C. D. and D. R. Canning. 1988. Gastrulation in birds: A model system for the study of animal morphogenesis. Experientia 44: 651-657.

Stern, C. D., G. W. Ireland, S. E. Herrick, E. Gherardi, J. Gray, M. Perryman and M. Stoker. 1990. Epithelial scatter factor and development of the chick embryonic axis. Development 110: 1271-1284.

Storey, K. G., A. Goriely, C. M. Sargent, J. M. Brown, H. D. Burns, H. M. Abud and J. K. Heath. 1998. Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. Development 125: 473-484.

Strahle, U. and S. Jesuthasan. 1993. Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos: Evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly. Development 119: 451-453.

Streit, A. and C. D. Stern. 1999. More to neural induction than inhibition of BMPs. In S. Mooney (ed.), Cell Lineage and Fate Determination. Academic Press, New York, pp. 437-449.

Streit, A., A. J. Berliner, C. Papanayoutou, A. Sirulnik and C. D. Stern. 2000. Initiation of neural induction by FGF signaling before gastrulation. Nature 406: 74-78.

Strickland, S., E. Reich and M. I. Sherman. 1976. Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell 9: 231-240.

Sulik, K., D. B. Dehart, J. L. Carson, T. Vrablic, K. Gesteland and G. C. Schoenwolf.1994. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. Dev. Dynam. 201: 260-278.

Supp, D. M., D. P. Witte, S. S. Potter and M. Brueckner. 1997. Mutation of an axonal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. Nature 389: 963-966.

Tanaka, S., T. Kunath, A.-K. Hadjantonakis, A. Nagy and J. Rossant. 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. Science 282: 2072-2075.

Thomas, P. Q. and R. S. P. Beddington. 1996. Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. Curr. Biol. 6: 1487-1496.

Trinkaus, J. P. 1984. Mechanisms of Fundulus epiboly: A current view. Am. Zool. 24: 673-688.

Trinkaus, J. P. 1992. The midblastula transition, the YSL transition, and the onset of gastrulation in Fundulus. Development [Suppl.] 1992: 75-80.

Trinkaus, J. P. 1993. The yolk syncitial layer of Fundulus: Its origin and history and its significance for early embryogenesis. J. Exp. Zool. 265: 258-284.

Trinkaus, J. P. 1996. Ingression during early gastrulation of Fundulus. Dev. Biol. 177: 356-370.

Tuchmann-Duplessis, H., G. David and P. Haegel. 1972. Illustrated Human Embryology, Vol. 1. Springer-Verlag, New York.

Vakaet, L.1984. The initiation of gastrula ingression in the chick blastoderm. Am. Zool. 24: 555-562.

Waddington, C. H. 1932. Experiments in the development of chick and duck embryos cultivated in vitro. Phil. Trans. R. Soc. Lond. [B] 13: 221.

Waddington, C. H.1933. Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. J. Exp. Zool. 10: 38-46.

Warga, R. M. and C. B. Kimmel. 1990. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. Development 108: 569-580.

Wiley, L. M. 1984. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocoel fluid. Dev. Biol. 105: 330-342.

Wilkinson, D. G., S. Bhatt, M. Cook, E. Boncinelli and R. Kruflauf. 1989. Segmental expression of Hox-2 homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. Nature 341: 405-409.

Wolpert, L., R. Beddington, J. Brockes, T. Jessell P. Lawrence and E. Meyerowitz. 1998. Principles of Development. Current Biology Ltd., London.

Yamanaka, Y. and 7 others. 1998. A novel homeobox gene, dharma, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. Genes Dev. 12: 2345-2353.

Yamashita, S., C. Miyagi, A. Carmany-Rapey, T. Shimizu, R. Fuji, A. F. Schier and T. Hirano. 2002. Stat3 controls cell movements during zebrafish gastrulation. Dev. Cell 2: 363-375.

Yamazaki, K. and Y. Kato.1989. Sites of zona pellucida shedding by mouse embryo other than mural trophectoderm.J. Exp. Zool. 249: 347-349.

Yokoyama, T., N . G. Copeland, N. A. Jenkins, C. A. Montgomery, F. F. B. Llder and P. A. Overbeek 1993. Reversal of left-right symmetry: A situs in versus mutation. Science 260: 679-682.

Zhong, T. P., S. Childs, J. P. Leu and M. C Fishman. 2001. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. Nature 414: 216-220.

Parte III Desarrollo embrionario tardío



Esqueleto cartilaginoso de un embrión de ratón de 17 días. El cartílago de Meckel se ve prominente en el maxilar inferior, extendiéndose desde el oído medio hacia el extremo distal de la mandíbula. Más tarde, la porción proximal de este cartílago se osificará formando los huesos del martillo y del yunque del oído medio. (Figura 11-45 cortesía del Dr. G. Morris-Kay.)

Capítulo 12 El surgimiento del ectodermo: el sistema nervioso central y la epidermis

Este proceso es para el verdadero asombro, si uno desea asombrarse. Usted empieza como una sola célula derivada del acoplamiento de un espermatozoide y un ovocito; ésta se divide en dos, luego en cuatro, luego en ocho, y así sucesivamente, y allí, en un determinado estadio, surge una sola célula que tiene como toda su progenie al cerebro humano. La mera existencia de semejante célula debería ser uno de los mayores asombros de la tierra. La gente debería darle vueltas todo el día, estar durante toda su vigilia llamándose el uno al otro en una admiración interminable, hablando solo de esta célula.

LEWIS THOMAS (1979)

Aún más atrayente que el bosque virgen era la selva que se encontraba ante mí en ese momento: el sistema nervioso central.

RITA LEVI-MONTALCINI (1988)

"La pregunta que quizá sea la más enigmática de todas es si el cerebro es lo suficientemente poderoso como para resolver el problema de su propia creación." Así Gregor Eichele (1992) terminó una revisión de investigación sobre el desarrollo del cerebro de mamíferos. La construcción de un órgano que percibe, piensa, ama, odia, recuerda, cambia, se autoengaña y coordina nuestros procesos corporales concientes e inconcientes es, sin lugar a dudas, el mayor desafío de todos los enigmas del desarrollo. Una combinación de aproximaciones genética, celular y de organismos nos está dando un entendimiento preliminar de cómo llega a ordenarse la anatomía básica del cerebro.

Los destinos del ectodermo del vertebrado se muestran en la figura 12-1. En los dos capítulos anteriores, se ha visto cómo el ectodermo es instruido a formar el sistema nervioso y la epidermis del vertebrado. Una porción del ectodermo dorsal es especificada a convertirse en ectodermo neural y estas células llegan a ser reconocibles por su aspecto columnar. Esta región del embrión es denominada la **placa neural**. El proceso por el cual este tejido forma un **tubo neural**, el rudimento del sistema nervioso central, es denominado **neurulación** y un embrión que experimenta tales cambios es denominado una **néurula** (fig. 12-2). El tubo neural formará el cerebro en la parte anterior y la médula espinal en la posterior. En este capítulo se analizará el proceso por el cual se originan y adquieren sus patrones característicos el tubo neural y la epidermis.

Establecimiento de las células neurales

En capítulos anteriores, se ha visto que las células neurales llegan a especificarse mediante sus interacciones con otras células. Hay al menos cuatro estadios a través de los cuales las células pluripotenciales del epiblasto o de la blástula se convierten en células precursoras neurales, o **neuroblastos** (Wilson y Edlund 2001):

- **Competencia**, en la cual las células pueden llegar a ser neuroblastos si son expuestas a la combinación apropiada de señales.
- **Especificación**, en la que las células han recibido las señales apropiadas para llegar a ser neuroblastos, pero el avance por el camino neural de la diferenciación todavía puede ser reprimido por otras señales.
- **Compromiso (determinación)**, en la cual los neuroblastos han entrado en el camino de la diferenciación neural y llegarán a ser neuronas incluso ante la presencia de señales inhibidoras neurales.
- **Diferenciación,** en la cual los neuroblastos dejan el ciclo mitótico y expresan los genes característicos de las neuronas.

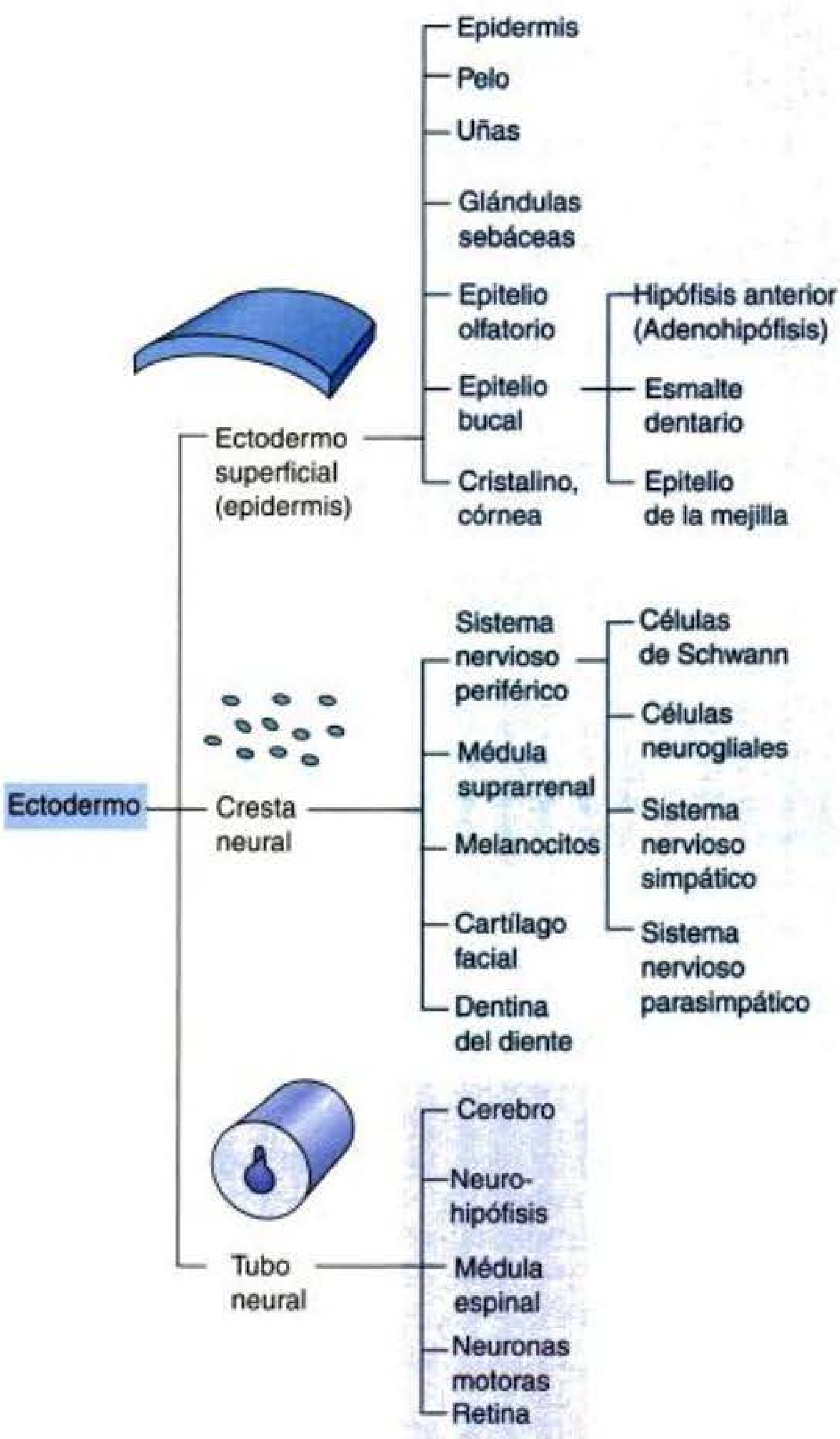


Fig. 12-1. Principales derivados de la capa germinativa ectodérmica. El ectodermo es dividido en tres dominios principales: el ectodermo superficial (epidermis primaria), la cresta neural (neuronas periféricas, células pigmentarias y cartílago facial) y el tubo neural (cerebro y médula espinal).

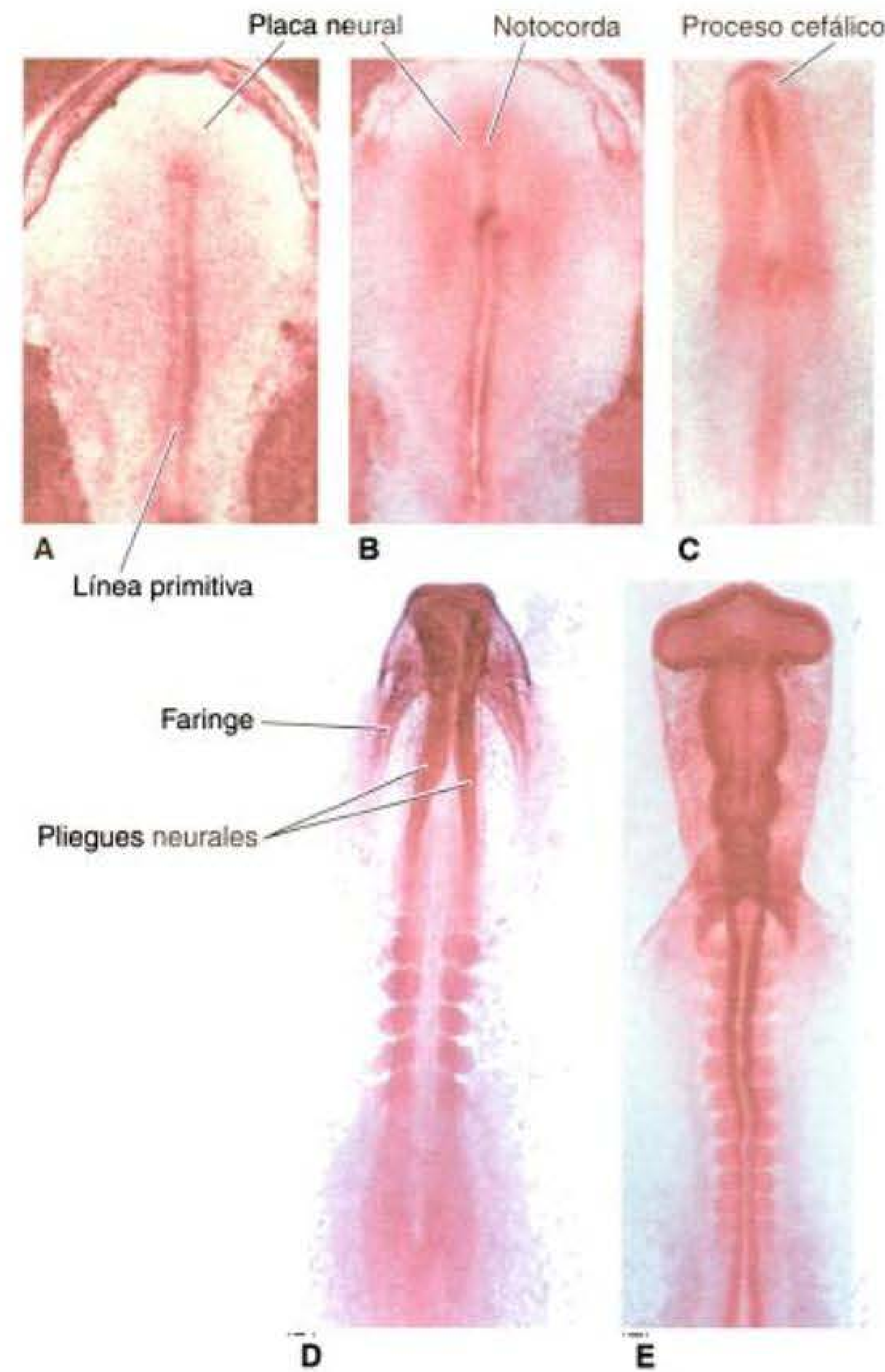
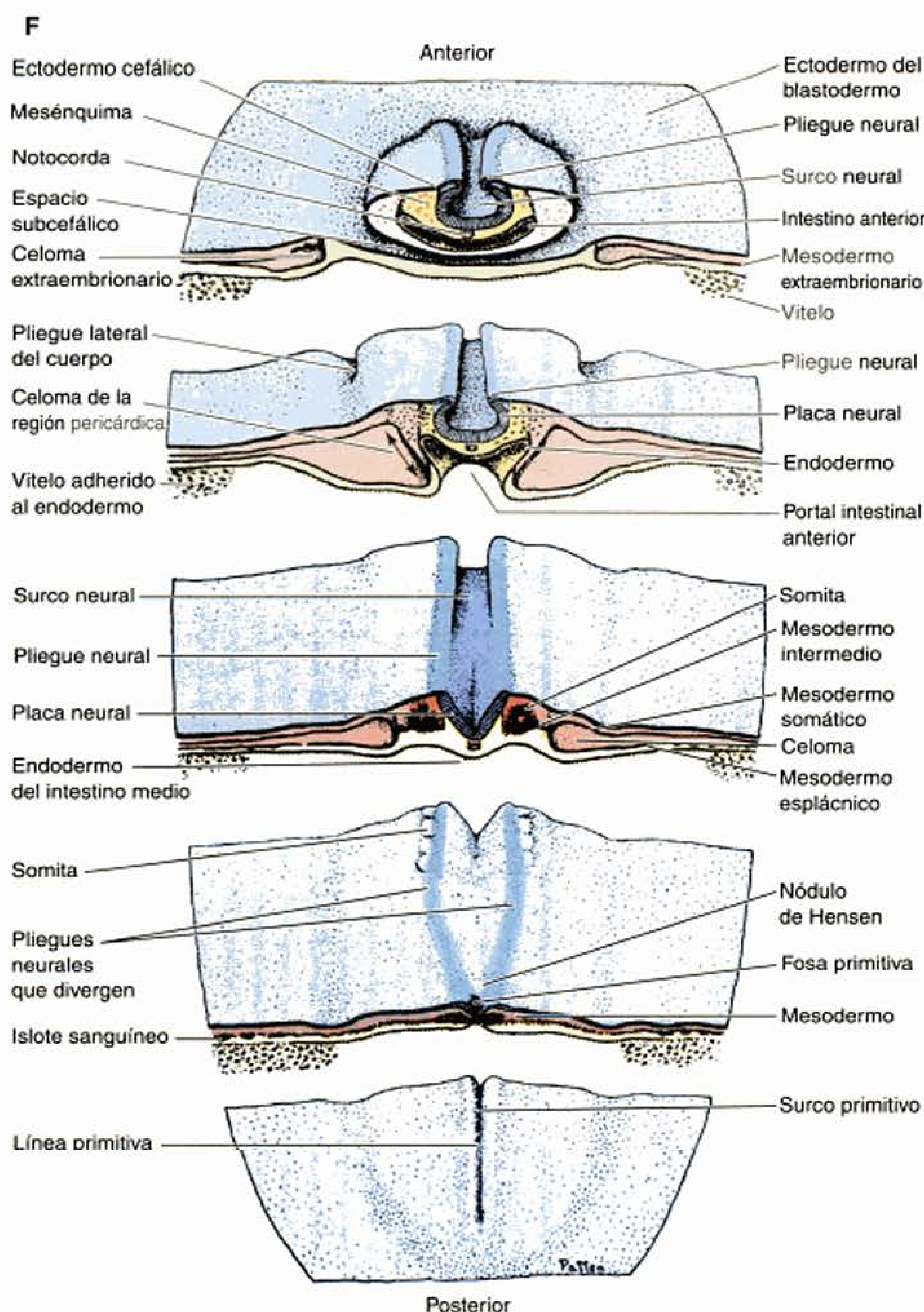


Fig. 12-2. Neurulación en un embrión de pollo (vista dorsal). **A.** Placa neural plana. **B.** Placa neural plana con notocorda subyacente (proceso cefálico). **C.** Surco neural. **D.** Tubo neural incipiente. **E.** Tubo neural que muestra las tres regiones principales del cerebro y la médula espinal. **F.** Embrión de pollo de 24 horas, como en **D.** La región cefálica (cabeza) ha experimentado la neurulación, mientras que las regiones caudales (cola) todavía están experimentando la gastrulación. (**A–E**, fotografías cortesía de G. C. Schoenwolf; **F**, según Patten 1971.)

Como se ha visto, la *especificación* de la placa neural es debida primariamente a los antagonistas de BMP como Nogina, cordina y folistatina. Sin embargo, la *competencia* de las células pluripotenciales para responder a las señales inductoras puede deberse a los factores de crecimiento fibroblástico. En el pollo, las células del epiblasto no son capaces de responder a los antagonistas de BMP a menos que ellas hayan sido expuestas previamente a alguna otra señal organizadora por 5 horas. Esta otra señal es probablemente un FGF, debido a que: 1) FGF8 es producido por las células precursoras de la línea primitiva; 2) FGF8 puede inducir la expresión de marcadores tempranos (pero no tardíos) de los precursores neurales del desarrollo y 3) la inhibición de la señal de FGF evita que se produzca la inducción neural, incluso cuando el nódulo de Hensen está produciendo sus antagonistas de BMP (Streit y col. 2000). Curiosamente, estos FGF pueden ser inhibidos por la señal de Wnt en las células epiblásticas *laterales*. (Wilson y col. 2001). Esta inhibición crea un límite entre las células epiblásticas neuralmente competentes que responden a los FGF y las células epiblásticas neuralmente incompetentes que sintetizan y responden a los Wnt. El compromiso de las células a un destino neural puede ser llevado a cabo a través de la vía del factor de crecimiento parecido a insulina, pero la evidencia para esto viene hasta ahora de *Xenopus* (Pera y col. 2001).

Formación del tubo neural

Hay dos modos principales para convertir la placa neural en un tubo neural. En la **neurulación primaria**, las células que rodean a la placa neural dirigen a las células de la placa neural a proliferar, invaginarse y separarse de la superficie para formar un tubo hueco. En la **neurulación**



secundaria, el tubo neural se origina a partir de la unión de las células mesenquimáticas para formar un cordón sólido que posteriormente se ahueca (cavita) para crear un tubo hueco. En general, la porción anterior del tubo neural es producida por neurulación primaria, mientras que la porción posterior del tubo neural es producida por neurulación secundaria. El tubo neural completo se forma por la unión de estos dos tubos formados separadamente.

En aves, todo el tubo neural anterior hasta el par de somitas veintiocho (es decir, todo lo anterior a las extremidades posteriores) es producido por neurulación primaria (Pasteels 1937; Catala y col. 1996). En mamíferos, la neurulación secundaria comienza a nivel de las vértebras sacras (Schoenwolf 1984; Nievelstein y col. 1993). En anfibios como *Xenopus*, solo el tubo neural de la cola es derivado a partir de neurulación secundaria (Gont y col. 1993). Este patrón también se produce en peces (al principio se pensaba que los tubos neurales en peces se formaban solamente por neurulación secundaria) (H. Sive y L. A. Hardaker, comunicación personal).

Neurulación primaria

Los acontecimientos de la neurulación primaria en el pollo y en la rana se ilustran en las figuras 12-2D, E y 12-3. Este proceso divide al ectodermo original en tres grupos de células: 1) el tubo neural localizado internamente, que formará el cerebro y la médula espinal, 2) la epidermis de la piel localizada externamente, y 3) las células de la cresta neural (véase fig. 12-1). Las células de la **cresta neural** se forman en la región que conecta el tubo neural y la epidermis, pero luego migran hacia otros sitios; ellas generarán las neuronas periféricas y la glía, las células pigmentadas de la piel (melanocitos) y varios tipos celulares más.

VADE MECUM[2] **Neurulación del pollo (chick neurulation).** Hacia las 33 horas de incubación, la neurulación en el embrión de pollo está bien encaminada. Se incluyen en este segmento embriones in toto y una serie completa de secciones transversales a través de un embrión de pollo de 33 horas de modo tal que usted puede ver este emocionante acontecimiento. Las secciones seriadas pueden visualizarse como un continuo en formato de película o individualmente, junto con las tinciones y los códigos de color que indican las capas germinales. **[Hacer clic sobre chick-Mid]**

El proceso de neurulación primaria parece ser similar en anfibios (fig. 12-4), reptiles, aves y mamíferos (Gallera 1971). Poco después de haberse formado la placa neural, sus bordes aumentan de grosor y se mueven hacia arriba para formar los **pliegues neurales**, mientras que aparece un **surco neural** con forma de U en el centro de la placa y divide los futuros lados derecho e izquierdo del embrión (véanse figs. 12-2C y 12-3). Los pliegues neurales migran hacia la línea media del embrión, fusionándose finalmente para formar el tubo neural por debajo del ectodermo que lo recubre. Las células en la porción más dorsal del tubo neural se convierten en las células de la cresta neural.

La neurulación primaria puede dividirse en cuatro estadios distintos pero superpuestos de manera espacial y temporal: 1) *formación* de la placa neural; 2) *modelado* de la placa neural; 3) *flexión* de la placa neural para formar el surco neural y 4) *cierre* del surco neural para formar el tubo neural (Smith y Schoenwolf 1997; Colas y Schoenwolf 2001; véase fig. 12-2).

FORMACIÓN Y MODELADO DE LA PLACA NEURAL. El proceso de neurulación comienza cuando el mesodermo dorsal subyacente (y el endodermo faríngeo en la región de la cabeza) señaliza a las células ectodérmicas por arri-

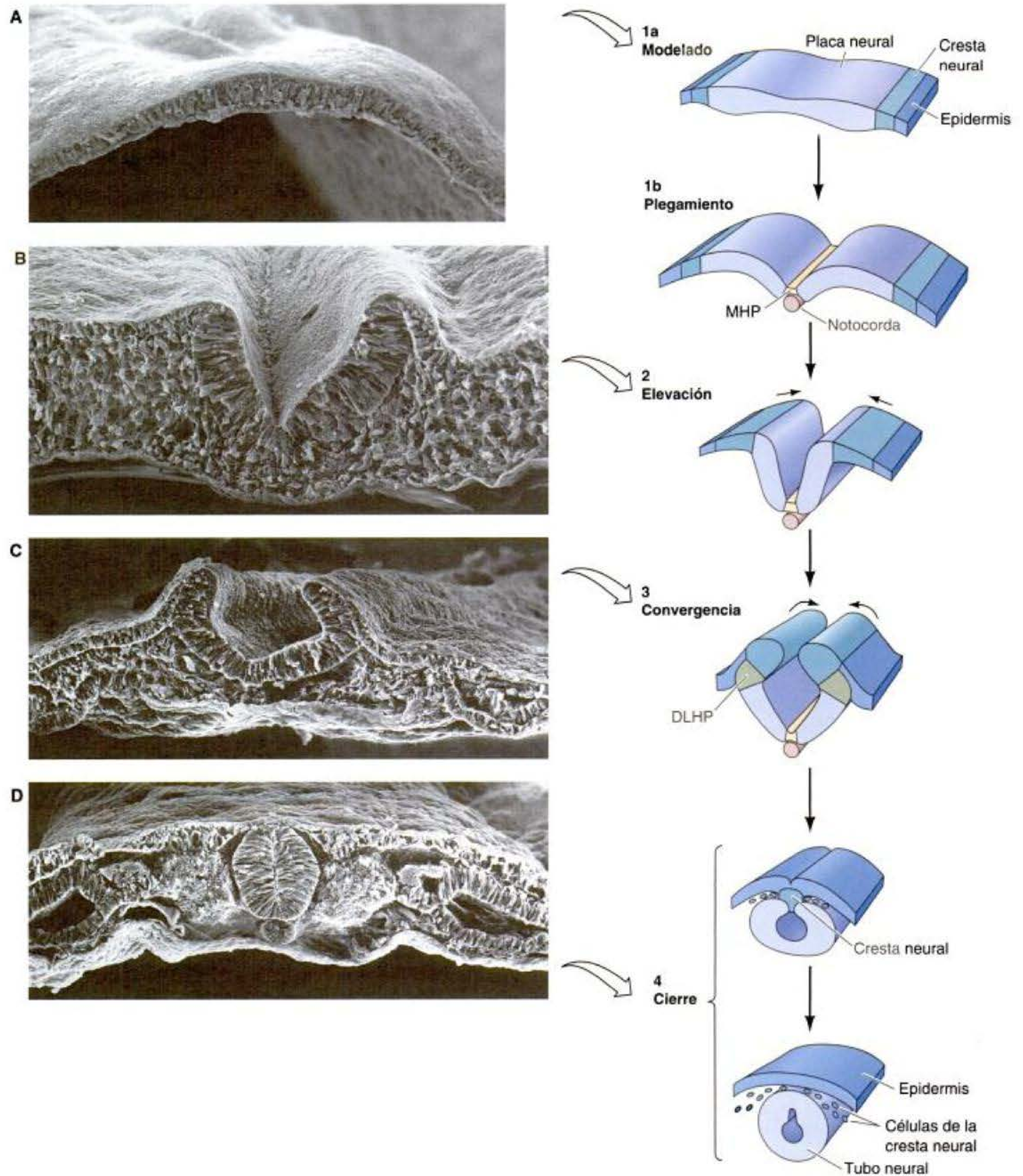


Fig. 12-3. Neurulación primaria: formación del tubo neural en el embrión de pollo. **A, 1.** Las células de la placa neural pueden distinguirse como células alargadas en la región dorsal del ectodermo. El plegamiento comienza a medida que las células del punto bisagra neural medial (MHP) se anclan a la notocorda y cambian su forma, mientras que las células epidérmicas presuntivas se mueven hacia la línea media dorsal. **B, 2.** Los pliegues neurales son elevados a medida que la epidermis presuntiva continúa moviéndose hacia la línea media dorsal. **C, 3.** Se produce la convergencia de los pliegues neurales a medida que las células del punto bisagra dorsolateral (DLHP) adoptan forma de cuña y las células epidérmicas empujan hacia el centro. **D, 4.** Los pliegues neurales son traídos en contacto uno con otro y las células de la cresta neural unen el tubo neural con la epidermis. Las células de la cresta neural luego se dispersan, dejando al tubo neural separado de la epidermis. (Microfotografías cortesía de K. Tosney y G. Schoenwolf; dibujos según Smith y Schoenwolf 1997.)

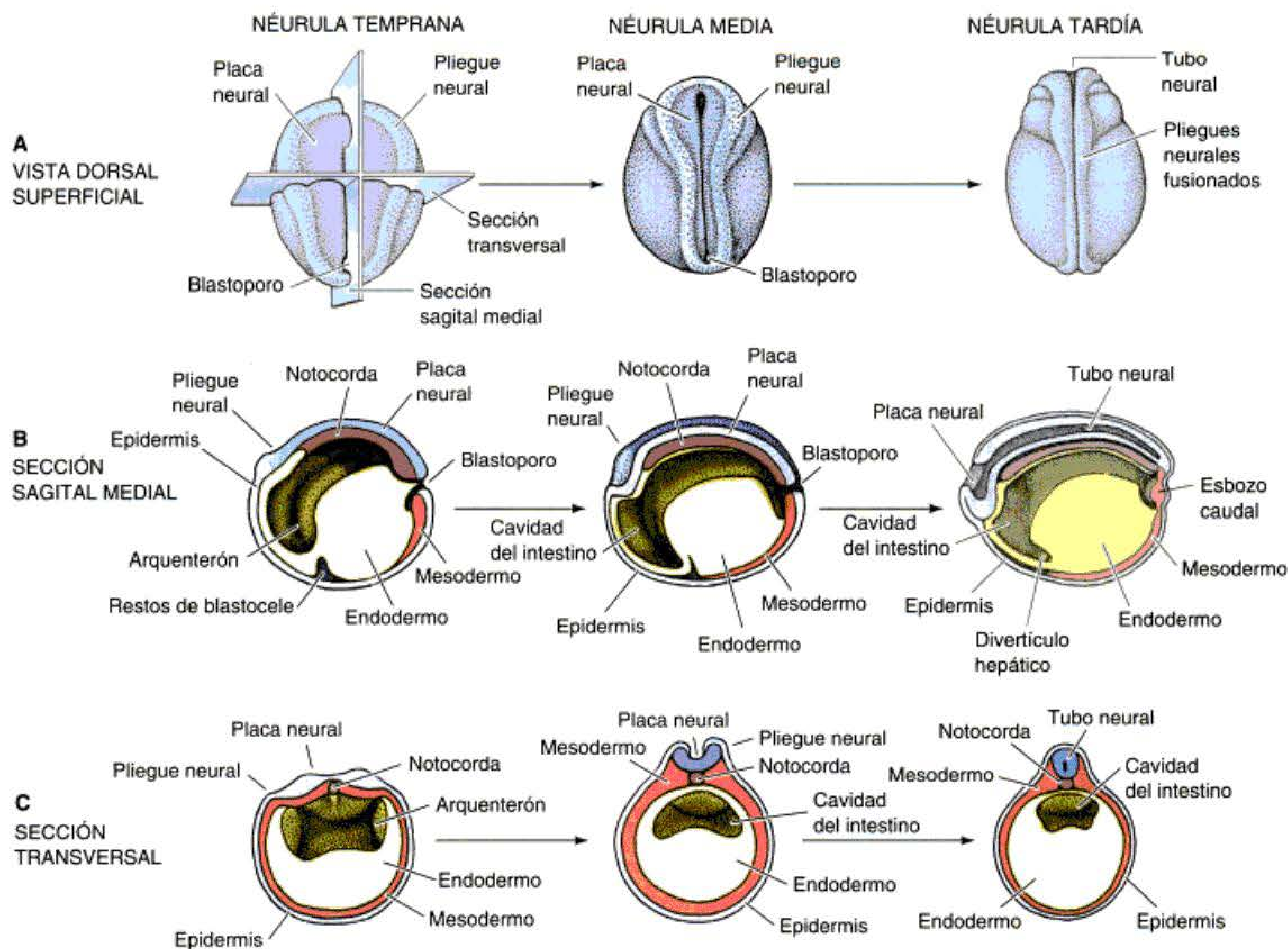


Fig. 12-4. Tres vistas de la neurulación en el embrión de anfibio, que muestran en cada caso la neurulación temprana (izquierda), media (centro) y tardía (derecha). **A.** Mirando hacia abajo sobre la superficie dorsal del embrión entero. **B.** Sección sagital a través del plano medio del embrión. **C.** Sección transversal a través del centro del embrión. (Según Balinsky 1975.)

ba de éste para alargar a las células de la placa neural a columnares (Smith y Schoenwolf 1989; Keller y col. 1992). Esta forma alargada distingue a las células de la placa neural prospectiva de las células más planas pre-epidérmicas que las rodean. Tanto como el 50% del ectodermo es incluido en la placa neural. Ésta es modelada por los movimientos intrínsecos de las regiones epidérmicas y de la placa neural. La placa neural se extiende a lo largo del eje anteroposterior y se estrecha de modo tal que la flexión posterior formará un tubo (en lugar de una cápsula esférica).

En anfibios (véase fig. 12-4) y en amniotas, el alargamiento y el estrechamiento por extensión convergente de la placa neural intercala varias capas de células en una pocas capas. Además, las divisiones de las células de la placa neural son preferencialmente en dirección **rostral-caudal** (pico-cola; anteroposterior) (Jacobson y Sater 1988; Schoenwolf y Alvarez 1989; Sausedo y col. 1997; véanse figs. 12-2 y 12-3). Estos acontecimientos se producen incluso si son separados los tejidos involucrados. Si se aísla la placa neural, estas células convergen y extienden para producir una placa más delgada, pero no pueden enrollarse en un tubo neural. Sin embargo, si la "región del borde" que contiene los tejidos de la epidermis presuntiva y de la placa neural es aislada, formará pequeños pliegues neurales en cultivo (Jacobson y Moury 1995; Moury y Schoenwolf 1995).

SITIO WEB 12.1 **Formación de las células de la placa del piso (Formation of the floor plate cells).** Una de las principales polémicas en neurobiología del desarrollo tiene que ver con el origen de las células que forman el piso (o suelo) ventral del tubo neural. Es posible que estas células sean derivadas directamente de la notocorda y no se originen del ectodermo superficial.

FLEXIÓN DE LA PLACA NEURAL. La flexión de la placa neural involucra la formación de regiones bisagra donde la placa neural contacta a los tejidos de alrededor. En aves y mamíferos, las células en la línea media de la placa neural reciben la denominación de **células del punto bisagra medio** (**MHP;** del inglés: *medial hinge point*).

Estas células derivan de la porción de la placa neural justo anterior del nódulo de Hensen y de la línea media anterior del nódulo de Hensen (Schoenwolf 1991a,b; Catala y col. 1996). Las células del MHP se anclan a la notocorda por debajo de ellas y forman una bisagra, que forma un surco en la línea media dorsal. La notocorda induce a las células MHP a disminuir su altura y a adquirir una forma de cuña (van Straaten y col. 1988; Smith y Schoenwolf 1989). Las células laterales a la MHP no experimentan tales cambios (fig. 12-3B, C). Poco tiempo después, otras dos regiones bisagra forman surcos cerca de la conexión de la placa neural con el resto del ectodermo. Estas regiones son denominadas **puntos bisagras dorsolaterales (DLHP**; del inglés: *dorsolateral hinge points*) y están anclados al ectodermo superficial de los pliegues neurales. Las células de los DLHP, también aumentan su altura y adquieren forma de cuña.

La adquisición de la forma de cuña por parte de la célula está íntimamente relacionada a cambios en su forma. En los DLHP, los microtúbulos y los microfilamentos están involucrados en estos cambios. Colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, inhibe el alargamiento de estas células, mientras que la citocalasina B, un inhibidor de la formación de los microfilamentos, evita el estrechamiento apical de estas células, inhibiendo de este modo la formación de la cuña (Burnside 1973; Karfunkel 1972; Nagele y Lee 1987). A medida que las células neuroepiteliales se extienden (por medio de los microtúbulos), los microfilamentos y sus proteínas regulatorias asociadas se acumulan en los extremos apicales de las células (Zolessi y Arruti 2001). La constricción de estos microfilamentos permite que se produzca el cambio de la forma celular. Después de la formación inicial del surco de la placa neural, la placa se flexiona o curva alrededor de estas regiones bisagra. Cada bisagra actúa como un eje que dirige la rotación de las células alrededor de ésta (Smith y Schoenwolf 1991).

Mientras tanto, también están funcionando fuerzas extrínsecas. El ectodermo superficial del embrión de pollo empuja hacia la línea media del embrión proporcionando otra fuerza motriz para la flexión de la placa neural (véase fig. 12-3C; Alvarez y Schoenwolf 1992; Lawson y col. 2001). Este movimiento de la epidermis presuntiva y el anclaje de la placa neural al mesodermo subyacente puede ser también importante para asegurar que el tubo neural se invagine *hacia* el embrión y no hacia fuera. Si se aíslan pequeños trozos del tubo neural del resto del embrión (incluido el mesodermo), tienden a enrollarse al revés (de adentro hacia afuera) (Shoenwolf 1991a). La capacidad de la epidermis presuntiva de empujar hacia el centro y la formación del surco del tubo neural crean los pliegues neurales.

CIERRE DEL TUBO NEURAL El tubo neural se cierra a medida que el par de pliegues neurales es llevado hacia la línea media dorsal. Los pliegues se adhieren entre sí y las células a partir de ambos pliegues se fusionan. En algunas especies, las células en esta unión forman las células de la cresta neural. En aves, las células de la cresta neural no migran desde la región dorsal hasta después que el tubo neural se ha cerrado en este sitio. Sin embargo, en mamíferos, las células de la cresta neural craneal (que forman estructuras faciales y del cuello; véase capítulo 13) migran mientras los pliegues neurales están siendo todavía elevados (es decir, previo al cierre del tubo neural), mientras que en la región de la médula espinal, las células de la cresta neural no migran hasta que se ha producido el cierre (Nichols 1981; Erickson y Weston 1983).

El cierre del tubo neural no se produce simultáneamente a lo largo de todo el ectodermo. Esto se observa mejor en aquellos vertebrados (como aves y mamíferos) cuyo eje corporal es alargado antes de la neurulación. En amniotas, la inducción en la cabeza comienza antes de la inducción en el tronco, de modo que en un embrión de pollo de 24 horas, la neurulación en la región **cefálica** (cabeza) está bien avanzada, mientras que la región **caudal** (cola) del embrión todavía está experimentando la gastrulación (véase fig. 12-2F). Los dos extremos abiertos del tubo neural son denominados el **neuroporo anterior** y el **neuroporo posterior**.

A diferencia de la neurulación en pollos, en la que el cierre del tubo neural es iniciado a nivel del futuro cerebro medio y "a modo de cierre de una cremallera" en ambas direcciones, el cierre del tubo neural en mamíferos es iniciado en varios lugares a lo largo del eje anteroposterior (Golden y Chernoff 1993; Van Allen y col. 1993; Nakatsu y col. 2000). Se producen diferentes **defectos del tubo neural** cuando varias partes del tubo fallan en el cierre (fig. 12-5). El fracaso del cierre de las regiones *posteriores* del tubo neural humano en el día 27 (o la ruptura del neuroporo posterior poco tiempo después) da como resultado una anomalía denominada **espina bífida**, en la que la severidad dependerá de cuánto de la médula espinal ha quedado expuesto. La falla del cierre de las regiones *anteriores* del tubo neural da como resultado una anomalía letal, **anencefalia**, en la que el cerebro anterior se mantiene en contacto con el fluido amniótico y posteriormente degenera. El desarrollo del cerebro fetal se detiene y no se forma la bóveda craneana. La falla del cierre de la totalidad del tubo neural sobre toda la extensión del eje corporal es denominada **craneorraquisquisis.** En conjunto, los defectos del tubo neural no son poco comunes en humanos, ya que se observan en cerca de 1 cada 500 nacidos vivos. Los defectos del cierre del tubo neural pueden a menudo ser detectados durante el embarazo por varios exámenes físicos y químicos.

El cierre del tubo neural humano requiere de una interacción compleja entre los factores genéticos y ambientales (Botto y col. 1999). Ciertos genes, como *Pax3*, *sonic hedgehog* y *openbrain* son esenciales para la formación del tubo neural de mamíferos; pero los factores de la dieta, como el colesterol y el ácido fólico, también parecen ser críticos. Se ha estimado que cerca del 50% de los defectos del tubo neural humano puede evitarse por la administración suplementaria de ácido fólico (vitamina B_{12}) a la mujer embarazada, y el Ministerio de Salud de los Estados Unidos recomienda que todas las mujeres en edad fértil tomen 0,4 mg de folato diariamente para reducir el riesgo de defectos del tubo neural durante el embarazo (Milunsky y col. 1989; Czeizel y Dudas 1992; Centers for Disease Control 1992). Los fetos con mayor riesgo son aquellos con defectos genéticos en su producción de folato, que pueden constituir cerca del 10% de la población (Whitehead y col. 1995; DeMarco y col. 2000). Mientras que el mecanismo por el cual el folato ayuda al cierre del tubo neural no es entendido, estudios recientes (Saitsu y col. 2002) han demostrado una proteína que une folato sobre las regiones más dorsales del tubo neural del

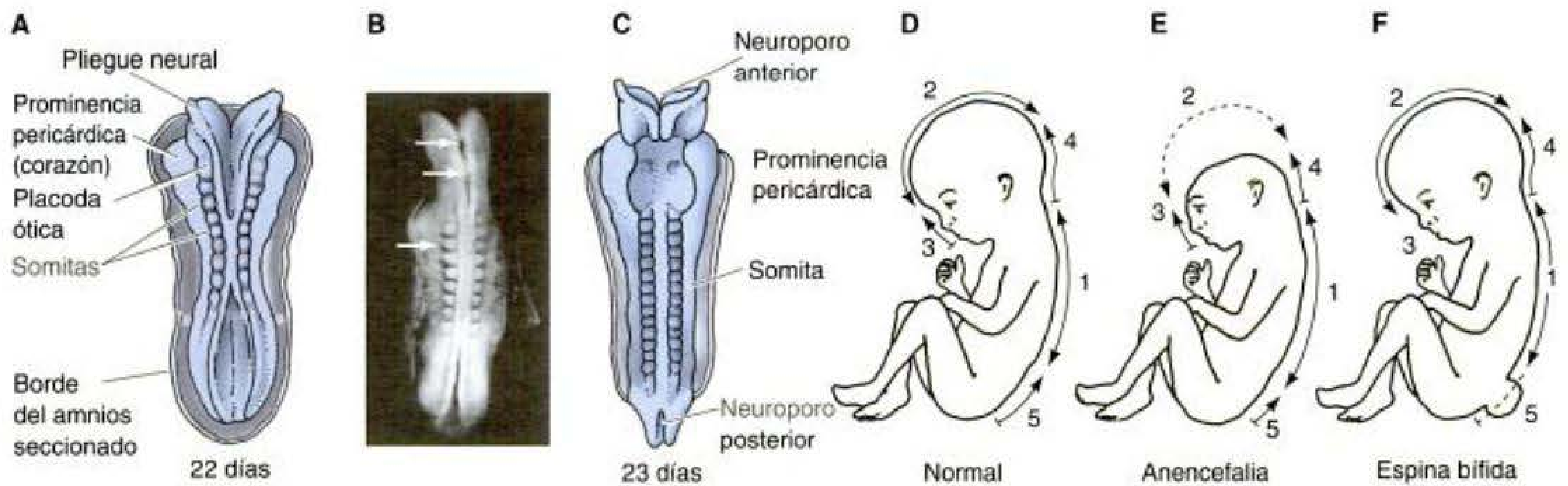


Fig. 12-5. Neurulación en el embrión humano. **A.** Vista dorsal de un embrión humano de 22 días (ocho somitas) que inicia la neurulación. Los neuroporos anterior y posterior están abiertos hacia el líquido amniótico. **B.** Un embrión humano de diez somitas que muestra regiones del tubo neural cerradas (flechas). **C.** Vista dorsal del embrión humano durante la neurulación con solo sus neuroporos abiertos. **D.** Regiones del tubo neural cerrado postuladas por la evidencia genética (superpuesto sobre el cuerpo del recién nacido). **E.** La anencefalia es causada por la falla de cierre del tubo neural en la región 2. **F.** La espina bífida es causada por la falla en la fusión de la región 5 (o de cierre del neuroporo posterior). (**B**, de Nakatsu y col., microfotografía cortesía de K. Shiota; **D–F**, según Van Allen y col. 1993.)

ratón inmediatamente previo a la fusión. Pero, la deficiencia de folato parece ser solo un factor de riesgo para los defectos del tubo neural. Madres de grupos socioeconómicos bajos parecen tener una alta incidencia de recién nacidos con defectos del tubo neural, incluso cuando se tiene en cuenta el uso de vitaminas (Little y Elwood 1992a; Wasserman y col. 1998). Además, parece haber una variación estacional en la incidencia de defectos del tubo neural que continúa sin ser explicada (Little y Elwood 1992b).

El tubo neural finalmente forma un cilindro cerrado que se separa del ectodermo superficial. Se piensa que está separación está mediada por la expresión de diferentes moléculas de adhesión. Aunque las células que llegarán a ser el tubo neural originalmente expresan cadherina-E, ellas detienen la producción de esta proteína cuando se forma el tubo neural y en su lugar sintetizan cadherina-N y N-CAM (fig. 12-6). Como resultado, los tejidos del ectodermo superficial y del tubo neural no se adhieren por mucho más tiempo entre sí. Si se hace que el ectodermo superficial exprese experimentalmente cadherina-N (mediante la inyección del mRNA de la cadherina N en el embrión de *Xenopus* de una célula o de dos células), se evita drásticamente la separación del tubo neural desde la epidermis presuntiva (Detrick y col. 1990; Fujimori y col. 1990).

SITIO WEB 12.2 **Cierre del tubo neural (Neural tube closure).** El cierre del tubo neural es un acontecimiento complejo que puede ser influido por los genes y por el ambiente. Las interacciones entre los factores genéticos y ambientales ahora están siendo esclarecidas.

SITIO WEB 12.3 **Especificación homóloga del tejido neural (Homologous specification of the neural tissue).** El sistema nervioso del insecto se desarrolla de un modo muy diferente del sistema nervioso del vertebrado. Sin embargo, las instrucciones genéticas para la formación del sistema nervioso central y para la especificación de sus regiones parecen ser homólogas. En *Drosophila*, el destino neural a menudo depende del número de divisiones celulares que preceden a la diferenciación neuronal.

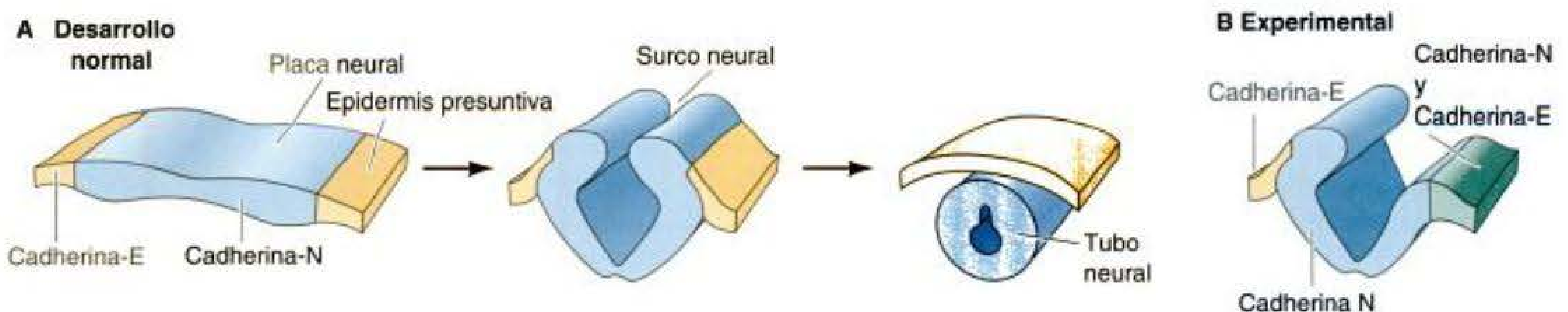


Fig. 12-6. Expresión de las proteínas de adhesión cadherinas-E y -N durante la neurulación en *Xenopus*. **A.** Desarrollo normal. En el estadio de placa neural, la cadherina-N es vista en la placa neural, mientras que la cadherina-E es vista sobre la epidermis presuntiva. Finalmente, las células neurales que llevan cadherina-N se separan de las células de la epidermis que contienen cadherina-E. (Las células de la cresta neural no expresan cadherina-N ni cadherina-E y se dispersan.) **B.** No se produce la separación del tubo neural cuando un lado del embrión de rana es inyectado con el mRNA de cadherina-N, de modo que la cadherina-N es expresada en las células epidérmicas y además en el tubo neural presuntivo.

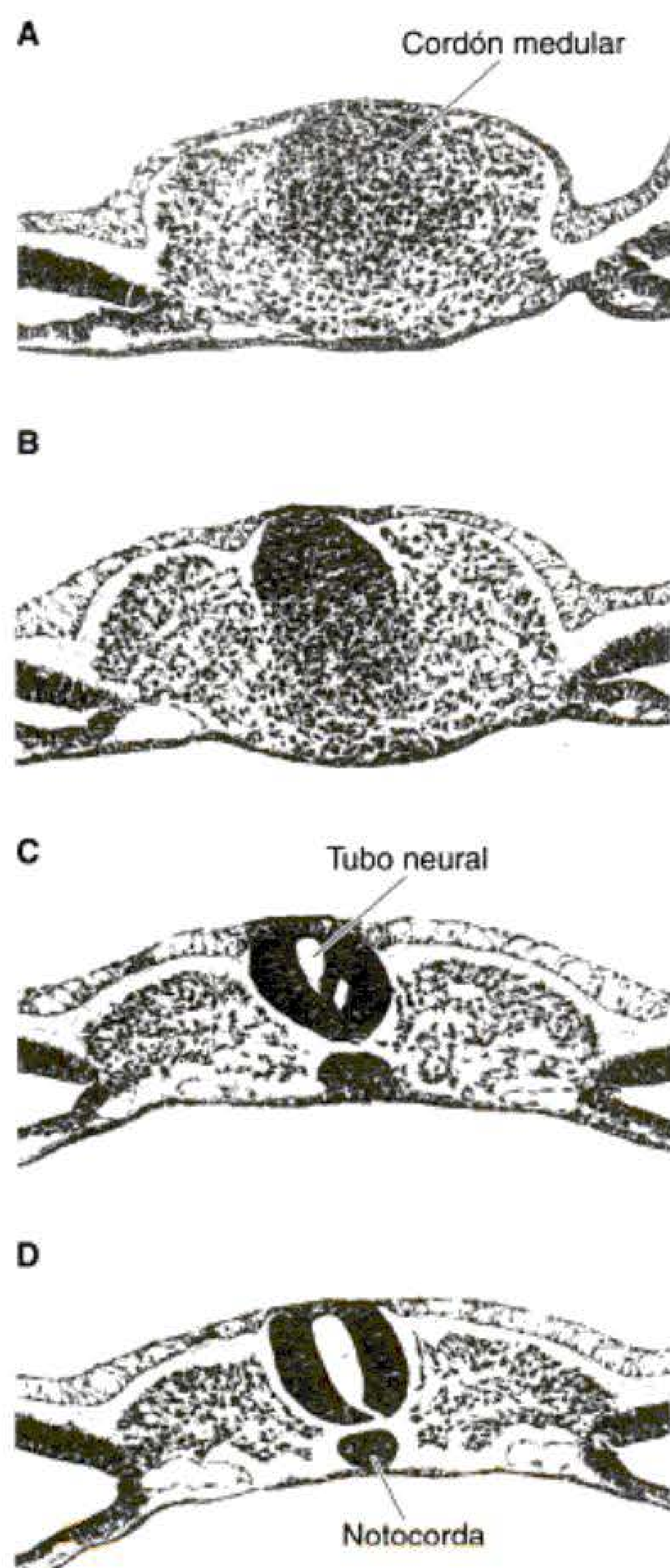


Fig. 12-7. Neurulación secundaria en la región caudal de un embrión de pollo de 25 somitas. **A.** El cordón medular se está formando en el extremo más caudal del esbozo de la cola del pollo. **B.** Cordón medular en una posición ligeramente más anterior en el esbozo de la cola. **C.** El tubo neural está cavitándose y se está formando la notocorda. **D.** Las cavidades se fusionan para formar el canal central del tubo neural. (De Catala y col. 1995; microfotografías cortesía de N. M. Le Douarin.)

Neurulación secundaria

La neurulación secundaria involucra la condensación de las células mesenquimáticas para formar un cordón medular por debajo del ectodermo superficial y el posterior ahuecamiento de este cordón formando el tubo neural (fig. 12-7). El conocimiento de los mecanismos de la neurulación secundaria puede ser importante en medicina, dada la frecuencia de las malformaciones humanas de la médula espinal posterior.

En ranas y pollos, la neurulación secundaria se produce con frecuencia en las vértebras lumbares (abdominales) y de la cola. En ambos casos, ésta puede verse como una continuación de la gastrulación. En la rana, las células del labio dorsal del blastoporo, en lugar de involucionar hacia el embrión continúan creciendo ventralmente (fig. 12-8A,B). La región en crecimiento en la punta del labio es denominada la **bisagra cordoneural** (Pasteels 1937) y contiene precursores de la porción más posterior de la placa neural y de la porción posterior de la notocorda. El crecimiento de esta región convierte a la gástrula casi esférica, 1,2 mm de diámetro, en un renacuajo linear de unos 9 mm de longitud. La punta de la cola es el descendiente directo del labio dorsal del blastoporo y las células que revisten al blastoporo forman el **canal neuroentérico**. La parte proximal del canal neuroentérico se fusiona con el ano, mientras la porción distal se convierte en el **canal ependimario** (es decir, la cavidad del tubo neural) (fig. 12-8C; Gont y col. 1993).

Diferenciación del tubo neural

La diferenciación del tubo neural en varias regiones del sistema nervioso central se produce simultáneamente de tres modos diferentes. A nivel anatómico, el tubo neural y su cavidad sobresalen y se estrechan formando las cámaras del cerebro y de la médula espinal. A nivel tisular, las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reorganizan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal. Por último, a nivel celular, las células neuroepiteliales se diferencian a numerosos tipos de células nerviosas (**neuronas**) y de sostén (**glía**) presentes en el cuerpo.

El desarrollo temprano de la mayoría de los cerebros de los vertebrados es semejante, pero debido a que el cerebro humano puede ser la porción de materia más organizada en el sistema solar y es posiblemente el órgano más interesante en el reino animal, el texto se concentrará sobre el desarrollo que se supone lleva a cabo el *Homo sapiens*.

El eje anteroposterior

El tubo neural temprano de mamíferos es una estructura recta. Sin embargo, incluso antes de que se haya formado la porción posterior, la porción más anterior del tubo está experimentando cambios drásticos. En esta región, el tubo neural se dilata en tres vesículas primarias (fig. 12-9): el cerebro anterior (**prosencéfalo**), el cerebro medio (**mesencéfalo**) y el cerebro posterior (**rombencéfalo**). En el momento en el que se cierra el extremo posterior del tubo neural, desde cada lado del cerebro anterior en desarrollo se extienden lateralmente prominencias secundarias: las **vesículas ópticas**.

El prosencéfalo se subdivide en el **telencéfalo** en una posición anterior y el **diencéfalo** más caudal*. El telen-

* *Nota del traductor:* algunos autores tienen en cuenta un modelo diferente de regionalización del cerebro anterior. En estos casos se basan en subdivisiones en segmentos transversales al eje longitudinal del sistema nervioso denominados prosómeras. Para el caso del cerebro anterior algunos autores lo dividen en 6 prosómeras y otros lo dividen inicialmente en un prosencéfalo secundario (un protosegmento que no se divide en prosómeras el cual da origen al telencéfalo y al diencéfalo rostral) y en un diencéfalo caudal (subdividido en 3 prosómeras). Según estos autores cada una de estas regiones se relaciona con derivados específicos. Para más detalles véase TINS 26:469-476 (2003).

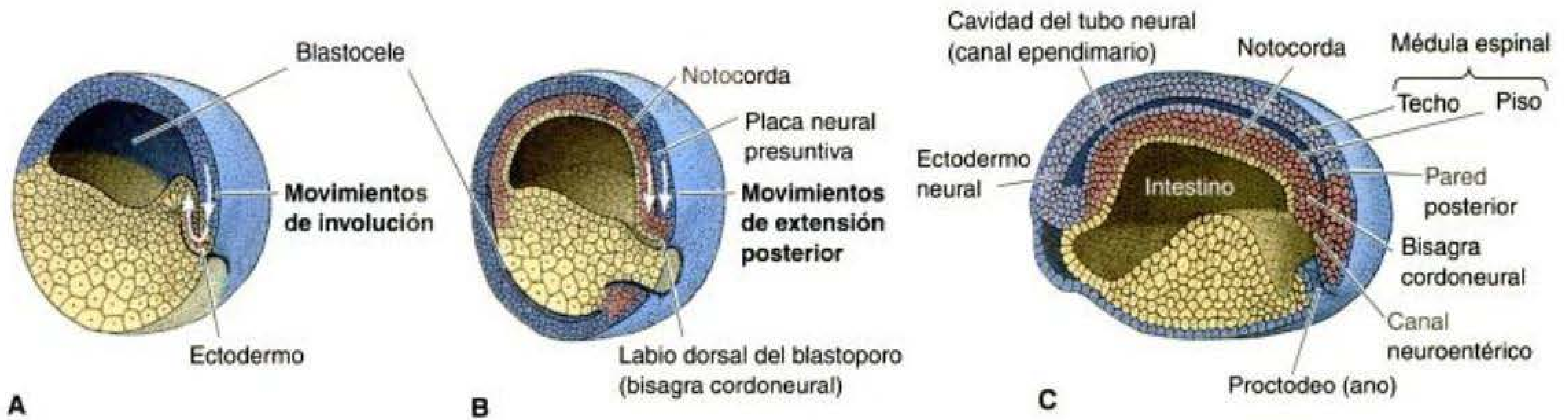


Fig. 12-8. Movimientos de las células durante la neurulación secundaria en *Xenopus*. **A.** Involución del mesodermo en el estadio de gástrula media. **B.** Movimientos del labio dorsal del blastoporo en el estadio de gástrula/néurula temprana. La involución ha cesado y el ectodermo y el mesodermo del labio del blastoporo tardío se mueven hacia posterior. **C.** Estadio de renacuajo temprano, en el cual las células que revisten el blastoporo forman el canal neurentérico, parte del cual se convierte en la cavidad del tubo neural secundario. (De Gont y col. 1993.)

céfalo finalmente formará los **hemisferios cerebrales** y el diencéfalo formará las regiones cerebrales **talámica** e **hipotalámica**, que reciben aferencias desde la retina. En efecto, la retina es un derivado del diencéfalo. El mesencéfalo no se subdivide y su cavidad finalmente se convierte en el **acueducto cerebral**. El rombencéfalo se subdivide en un **mielencéfalo** posterior y en un **metencéfalo** más anterior. El mielencéfalo finalmente llega a ser el **bulbo raquídeo**, cuyas neuronas generan los centros nerviosos ("núcleos") responsables de la transmisión del dolor para la cabeza y el cuello, de las conexiones auditivas, los movimientos de la lengua y el control del equilibrio, así como los movimientos respiratorios, gastrointestinales y cardiovasculares. El metencéfalo da origen al **cerebelo**, la parte del cerebro responsable de la coordinación de los movimientos de postura y equilibrio.

El rombencéfalo desarrolla un patrón segmentario que especifica el lugar donde se originan ciertos nervios. Dilataciones periódicas denominadas **rombómeras** dividen al rombencéfalo en compartimentos más pequeños. Las rombómeras representan "territorios" de desarrollo separados en los que las células dentro de cada rombómera pueden mezclarse libremente dentro de ésta, pero no con células de rombómeras adyacentes (Guthrie y Lumsden 1991). Además, cada rombómera tiene un destino de desarrollo diferente. Las células de la cresta neural por arri-

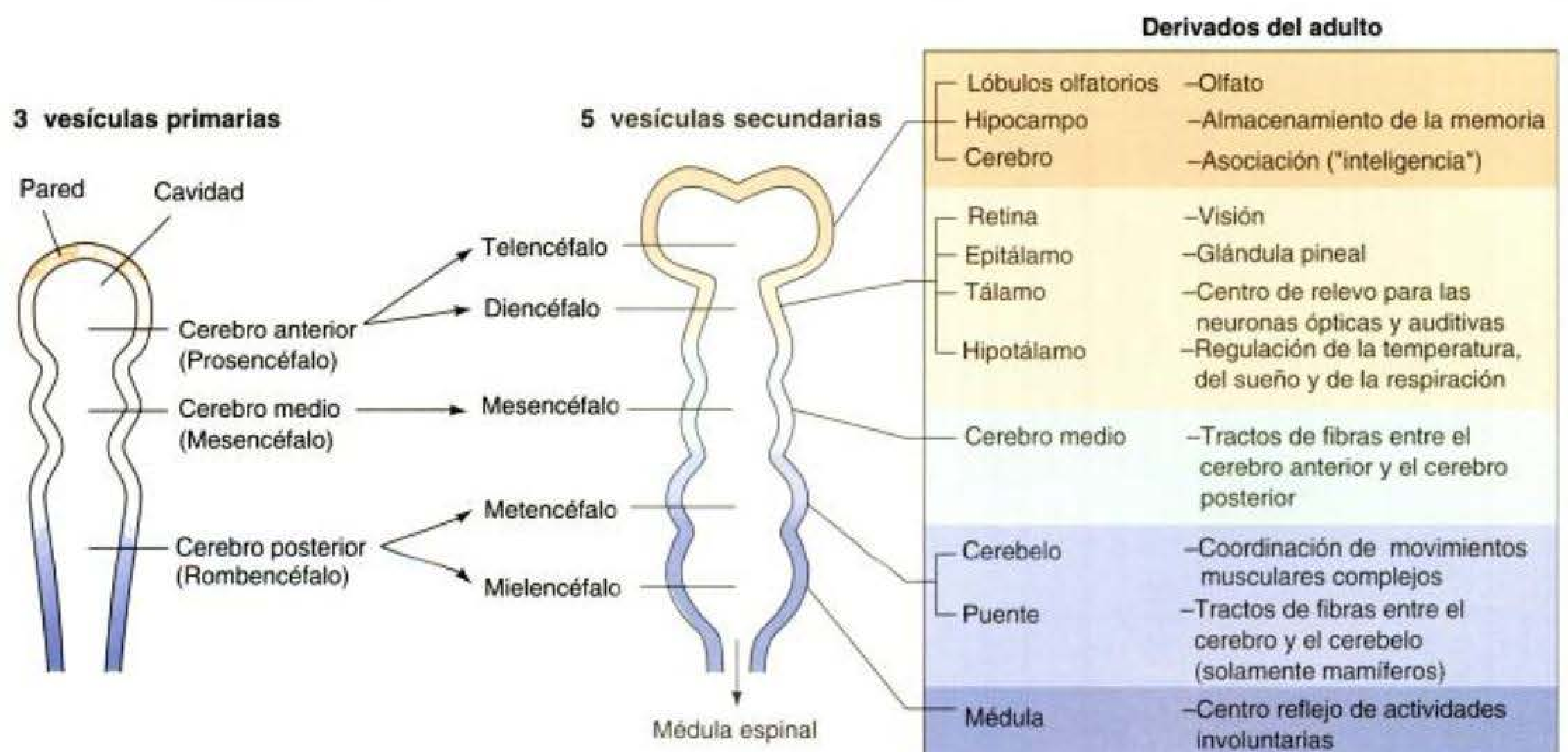


Fig. 12-9. Desarrollo temprano del cerebro humano. Las tres vesículas primarias son subdivididas a medida que el desarrollo continúa. A la derecha hay una lista de los derivados del adulto formados por las paredes y las cavidades del cerebro.* (Según Moore y Persaud 1993.)

* *Nota del traductor:* la subdivisión muestra una simplificación excesiva y los modelos actuales consideran en diversos vertebrados, incluido el ser humano, una detallada descripción de los núcleos y tractos nerviosos que componen cada región. Para una visión más profunda se sugiere al lector la consulta de textos específicos sobre la regionalización del cerebro.

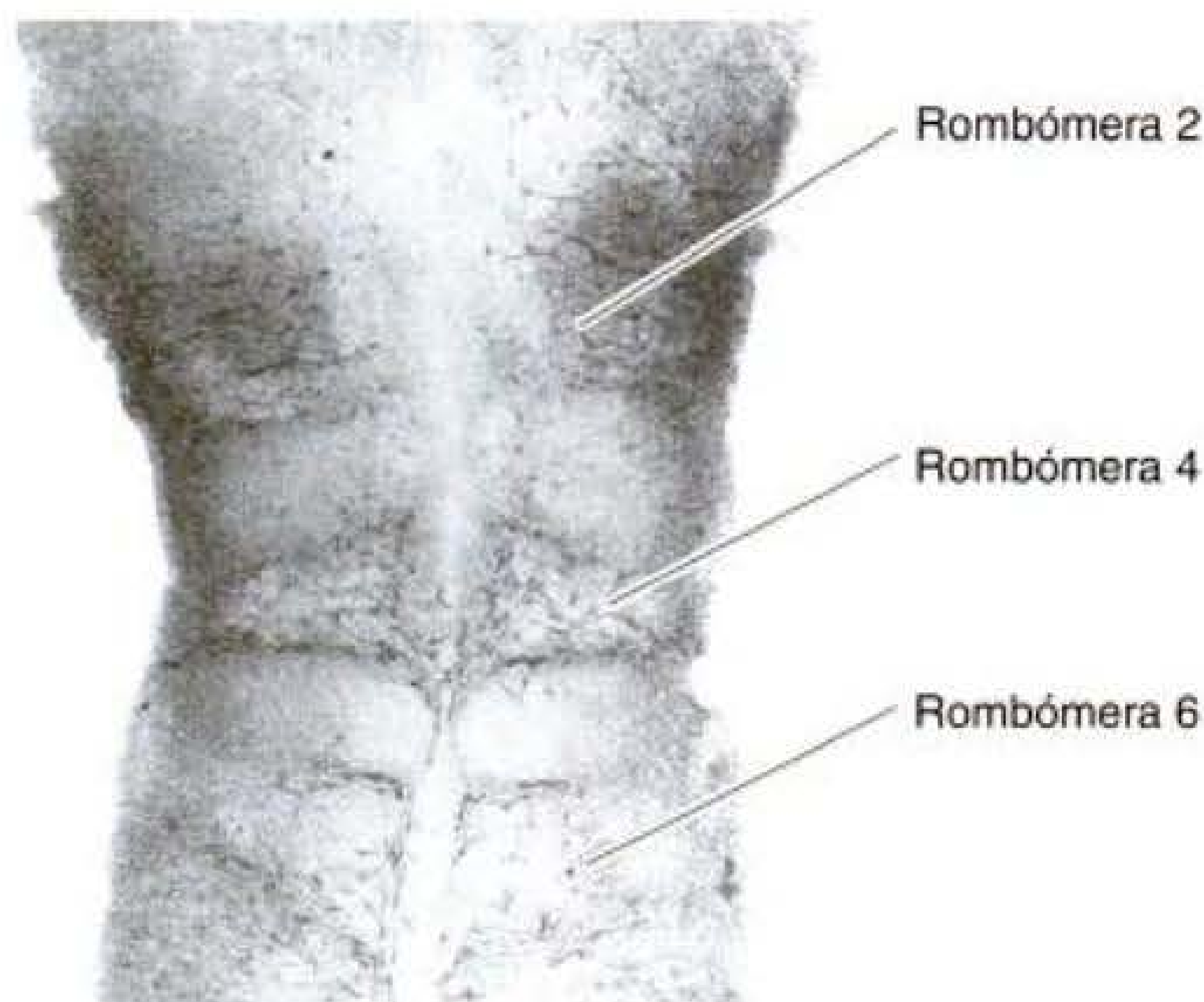


Fig. 12-10. Cerebro posterior (rombencéfalo) de un embrión de pollo de 2 días, abierto para mostrar las paredes laterales. Las neuronas fueron visualizadas con un anticuerpo que tiñe proteínas de neurofilamentos. Los rombómeros 2, 4 y 6 son distinguidos por la alta densidad de los axones en este estadio de desarrollo temprano. (De Lumsden y Keynes 1989; microfotografía cortesía de A. Keynes.)

ba de cada rombómera formarán **ganglios** -grupos de cuerpos celulares neuronales cuyos axones forman un nervio. La generación de los nervios craneales desde las rombómeras ha sido estudiada muy exhaustivamente en el pollo, en el que las primeras neuronas aparecen en rombómeras hasta ahora numeradas como r2, r4 y r6 (fig. 12-10; Lumsden y Keynes 1989). Las neuronas originadas desde el ganglio de r2 forman el quinto (trigeminal) nervio craneal; las de r4 forman el séptimo (facial) y octavo (acusticovestibular) nervios craneales y el noveno (glosofaríngeo) nervio craneal sale desde r6.

La dilatación del cerebro embrionario temprano es destacable en su velocidad, en su extensión y en que es principalmente el resultado de un incremento en el tamaño de la cavidad y no en el crecimiento de tejido. En el embrión de pollo, el volumen del cerebro se expande 30 veces entre los días 3 y 5 de desarrollo. Esta rápida expansión se piensa que es causada por la presión positiva de fluido ejercida contra las paredes del tubo neural por el líquido dentro de éste. Debería esperarse que esta presión de líquido pudiera ser disipada por la médula espinal, pero parece que esto no sucede. En su lugar, a medida que los pliegues neurales se cierran en la región entre el cerebro presuntivo y la médula espinal presuntiva, los tejidos dorsales de los alrededores empujan para estrechar al tubo neural en la base del cerebro (fig. 12-11; Schoenwolf y Desmond 1984; Desmond y Schoenwolf 1986; Desmond y Field 1992). Esta oclusión (que también se produce en el embrión humano) efectivamente separa la región cerebral presuntiva de la futura médula espinal (Desmond 1982). Si la presión de líquido en la porción anterior de tal tubo neural obstruido se extirpa experimentalmente, el cerebro del pollo aumenta de volumen en un grado menor y contiene muchas menos células que las que se encuentran en los embriones normales. La región ocluida del tubo neural vuelve a abrirse después del aumento de volumen rápido inicial de los ventrículos cerebrales.

El establecimiento del patrón anteroposterior del sistema nervioso es controlado por una serie de genes que incluyen a los complejos de genes Hox. Estos genes fueron discutidos más detalladamente en el capítulo 11 y serán tratados otra vez en el capítulo 23.

SITIO WEB 12.4 **Mapeo del mesencéfalo (Mapping the mesencephalon).** El cerebelo

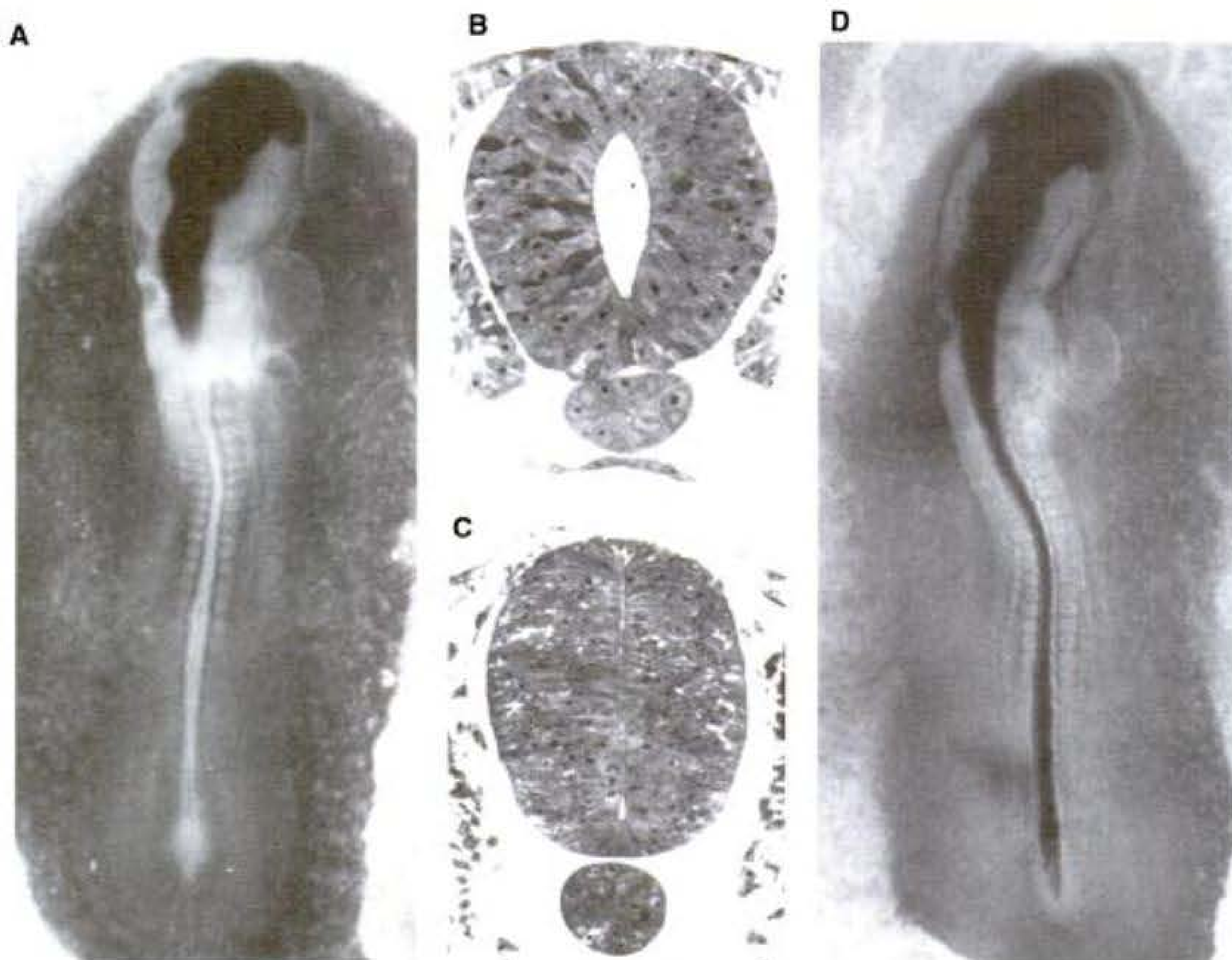


Fig. 12-11. La oclusión del tubo neural permite la expansión de la futura región cerebral. **A.** El colorante inyectado en la porción anterior del tubo neural de un pollo de 3 días llena la región del cerebro, pero no pasa hacia la región espinal. **B, C.** Secciones del tubo neural del pollo en la base del cerebro, **B**, antes de la oclusión y **C**, durante la oclusión. **D.** La reapertura de la oclusión después del aumento del volumen cerebral inicial le permite a los colorantes pasar desde la región del cerebro hacia la región de la médula espinal. (Microfotografías cortesía de M. Desmond.)

del pollo tiene un origen dual: la mayor parte de éste proviene del metencéfalo, pero algunas porciones vienen del mesencéfalo. Pueden trazarse anomalías genéticas a regiones cerebrales específicas mediante trasplantes entre regiones cerebrales tipo salvaje y mutantes.

SITIO WEB 12.5 **Especificación de los límites cerebrales (Specifying the brain boundaries).** Los factores de transcripción Pax6 y el factor paracrino FGF8 son críticos en el establecimiento de los límites del cerebro anterior, del cerebro medio y del cerebro posterior.

El eje dorsoventral

El tubo neural está polarizado a lo largo del eje dorsoventral. En la médula espinal, por ejemplo, la región *dorsal* es el lugar donde las neuronas espinales reciben la aferencia de las neuronas sensoriales, mientras que la región *ventral* es donde residen las neuronas motoras. En el medio hay numerosas interneuronas que transmiten información entre ellas. La polaridad dorsoventral del tubo neural es inducida por señales que vienen de sus ambientes inmediatos. El patrón ventral es impuesto por la notocorda, mientras que el patrón dorsal es inducido por la epidermis (fig. 12-12).

La especificación del eje dorsoventral del tubo neural es iniciada por dos factores paracrinos principales. El primero es la proteína Sonic hedgehog, originada desde la notocorda. El segundo grupo de factores son proteínas TGF-β, originadas en el ectodermo dorsal. En ambos casos, estos factores paracrinos inducen un segundo centro de señalización dentro del mismo tubo neural. Sonic hedgehog es secretado desde la notocorda e induce a las células bisagra mediales a convertirse en la **placa del piso o del suelo** del tubo neural. Las células de la placa del piso también secretan Sonic hedgehog y la proteína desde las células de la placa del piso forman un gradiente que es más elevado en la porción más ventral del tubo neural (Roelink y col. 1995; Briscoe y col. 1999).

Los destinos dorsales del tubo neural son establecidos por proteínas de la superfamilia TGF-β, especialmente las proteínas morfogenéticas del hueso 4 y 7, dorsalina y activina (Liem y col. 1995, 1997, 2000). Inicialmente, BMP4 y BMP7 se hallan en la epidermis. Justo cuando la notocorda establece un centro secundario de señalización –las células de la placa del suelo– sobre el lado ventral del tubo neural, la epidermis establece un centro de señalización secundario mediante la inducción de expresión de BMP4 en las células de la **placa del techo** del tubo neural. La proteína BMP4 desde la placa del techo induce una cascada de proteínas TGF-β en las células adyacentes (fig. 12-12C). Por esta razón diferentes grupos de células son expuestos a distintas concentraciones de las proteínas TGF-β a diferentes tiempos (lo más dorsal es expuesto a más factores en altas concentraciones y en tiempos tempranos).

Los factores paracrinos interactúan para instruir la síntesis de diferentes factores de transcripción a lo largo del eje dorsoventral del tubo neural. Por ejemplo, aquellas células adyacentes a la placa del piso que reciben altas concentraciones de Sonic hedgehog (y casi nada de la señal de TGF-β) sintetizan los factores de transcripción Nkx6.1 y Nkx2.2 y se convierten en las neuronas ventrales (V3). Las células dorsales a éstas, expuestas a un poco menos de Sonic hedgehog y a un poco más de los factores TGF-β, producen los factores de transcripción Nkx6.1 y Pax6. Estas células se convierten en las neuronas motoras (fig. 12-13). Los dos grupos siguiente de células, que reciben progresivamente menos Sonic hedgehog, se convierten en las interneuronas V2 y V1 (Lee y Pfaff 2001; Muhr y col. 2001).

La importancia de Sonic hedgehog en la inducción y en el establecimiento del patrón de la porción ventral del tubo neural puede demostrarse experimentalmente. Si se toman fragmentos de notocorda de un embrión y se trasplantan hacia el lado lateral del tubo neural del huésped, el tubo neural del huésped formará otro grupo de células de la placa del piso en el lado lateral (fig. 12-13B). Estas células de la placa del piso, una vez inducidas, inducen la formación de las neuronas motoras a cada lado de ellas. Los mismos resultados pueden obtenerse si se reemplazan los fragmentos de notocorda por bolitas de células cultivadas que secretan Sonic hedgehog (Echelard y col. 1993; Roelink y col. 1994). Además, si una porción de la notocorda es eliminada de un embrión, el tubo neural adyacente a la región extirpada no tendrá células de la placa del piso (Placzek y col. 1990; Yamada y col. 1991, 1993). La importancia de los factores de la superfamilia TGF-β en el establecimiento del patrón dorsal del tubo neural fue demostrada por mutantes del pez cebra. Aquellos mutantes deficientes en ciertas BMP carecían de tipos neuronales intermedios y dorsales (Nguyen y col. 2000).

SITIO WEB 12.6 **Construcción de la glándula hipófisis (Constructing the pituitary gland).** La genética del desarrollo de la hipófisis ha demostrado que (como en el tubo neural del tronco) las señales paracrinas provocan la expresión superpuesta de grupos de factores de transcripción. Estos factores regulan los diferentes tipos celulares de la glándula responsable de la producción de hormona del crecimiento, prolactina, gonadotropinas y otras hormonas.

Arquitectura del tejido del sistema nervioso central

Las neuronas del cerebro están organizadas en capas (**cortezas**) y grupos (**núcleos**); cada una tiene funciones y conexiones diferentes. El tubo neural original está compuesto de un **neuroepitelio germinal** -una capa de células madre neuronales que se dividen rápidamente y que tiene un espesor de una capa celular. Sauer (1935) y otros han demostrado que todas las células del epitelio germinal son continuas desde la superficie luminar del tubo neural hacia la superficie externa, pero que los núcleos de estas células están a diferentes alturas, dando de este modo la impresión superficial que el tubo neural tiene numerosas capas celulares. Los núcleos se mueven dentro de sus células a medida que ellos atraviesan el ci-

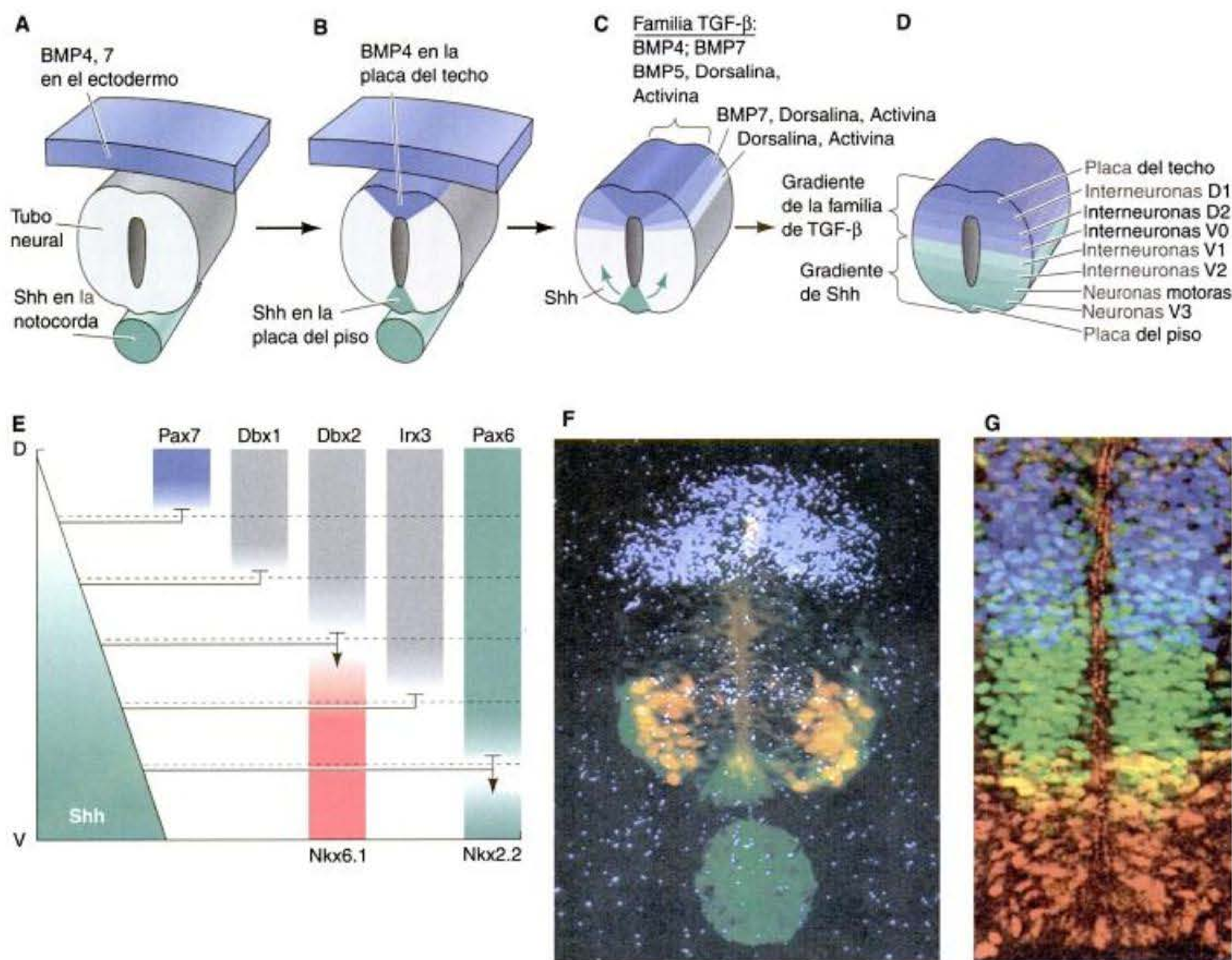


Fig. 12-12. Especificación dorsoventral del tubo neural. **A.** El tubo neural recién formado es influido por dos centros señalizadores. El techo del tubo neural es expuesto a BMP4 y BMP7 desde la epidermis y el piso (o suelo) del tubo neural es expuesto a la proteína Sonic hedgehog desde la notocorda. **B.** Los centros señalizadores secundarios son establecidos dentro del tubo neural. BMP4 es expresado y secretado desde las células de la placa del techo; Sonic hedgehog es expresado y secretado desde las células de la placa del piso. **C.** BMP4 establece un patrón anidado* de factores TGF-β, que se difunde ventralmente hacia el tubo neural desde la placa del techo. Sonic hedgehog se difunde dorsalmente como un gradiente desde las células de la placa del piso. **D.** Las neuronas de la médula espinal adquieren sus identidades mediante su exposición a estos gradientes de factores paracrinos. Las cantidades y tipos de factores parácrinos presentes hacen que, según su posición en el tubo neural, sean activados diferentes tipos de factores de transcripción en los núcleos de estas células. **E.** Sonic hedgehog es limitado a la región ventral del tubo neural por los factores TGF-β y el gradiente de Sonic hedgehog especifica al tubo neural ventral mediante la activación e inhibición de la síntesis de factores de transcripción particulares. **F.** Tubo neural del pollo, que muestra áreas de Sonic hedgehog (verde) y el dominio de expresión de la proteína dorsalina de la familia TGF-β (azul). Las neuronas motoras inducidas por una concentración particular de Sonic hedgehog son teñidas de naranja/amarillo. **G.** Hibridación in situ para tres factores de transcripción: Pax7 (rojo, característico de las células del tubo neural dorsal), Pax6 (verde) y Nkx6.1 (rojo). Donde Nkx6.1 y Pax6 se superponen (amarillo), son especificadas las neuronas motoras. (**E**, cortesía de T. M. Jessell; **F**, según Jessell 2000; **G**, cortesía de J. Briscoe.)

* *Nota del traductor:* la denominación de patrón anidado (nested) de expresión de genes hace referencia a que estos genes se integran topográficamente en dominios de distinto tamaño incluidos unos dentro de los otros. La expresión anidada de un gen implica estar contenida dentro de la de otro en una relación jerárquica no necesariamente causal, pero que conlleva la especificación de subregiones dentro del área mayor.

clo celular. La síntesis de DNA (fase S) se produce mientras el núcleo está en el borde externo del tubo neural y el núcleo migra hacia la cavidad a medida que avanza el ciclo celular (fig. 12-14). La mitosis se produce sobre el borde luminar (cavidad ventricular o ependimaria) de la capa celular. Si las células del tubo neural de mamíferos se marcan con timidina radiactiva durante el desarrollo temprano, el 100% de ellas incorporará esta base en su DNA (Fujita 1964). Poco tiempo después, ciertos tipos celulares detienen la incorporación de estos precur-

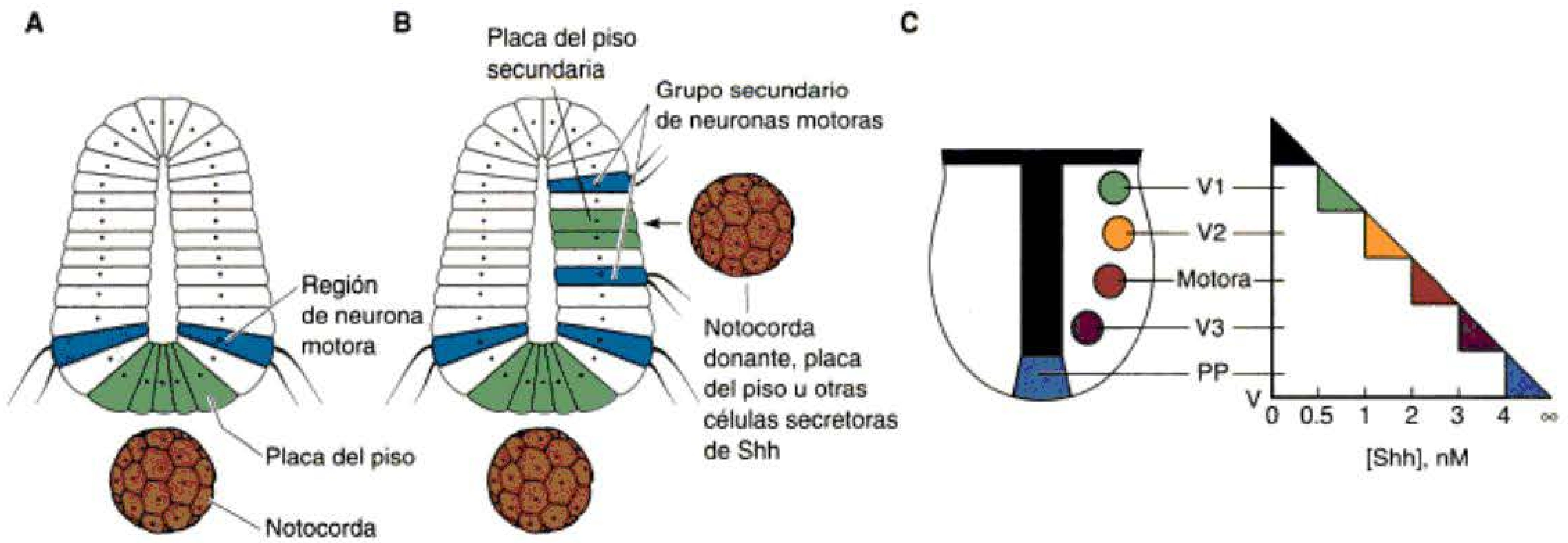


Fig. 12-13. Cascada de inducción iniciada por la notocorda en el tubo neural ventral. **A.** Dos tipos celulares en el tubo neural recién formado. Los cercanos a la notocorda se convierten en las neuronas de la placa del piso; las neuronas motoras surgen sobre los lados ventraterales. **B.** Si se coloca adyacente al tubo neural una segunda notocorda, placa del piso o cualquier otra célula secretora de Sonic hedgehog, ésta induce un segundo grupo de neuronas de la placa del piso, además de otros grupos de neuronas motoras. **C.** Relación entre las concentraciones de Sonic hedgehog, la generación de tipos particulares de neuronas in vitro y la distancia desde la notocorda. (**A**, **B**, según Placzek y col. 1990; **C**, según Briscoe y col. 1999.)

sores del DNA, indicando de este modo que ellos no participarán más en la síntesis de DNA y en la mitosis. Estas células luego migran y se diferencian a células neuronales y gliales fuera del epitelio germinal del tubo neural (Fujita 1966; Jacobson 1968).

Si las células en división en el neuroepitelio germinal son marcadas con timidina radiactiva en un único punto en su desarrollo, y sus progenies son halladas en la corteza en el cerebro adulto, entonces aquellas neuronas deben haber migrado hacia las posiciones corticales desde el neuroepitelio germinal. Esto sucede porque una célula madre neuroepitelial se divide "verticalmente" en lugar de "horizontalmente."* Por lo tanto la célula hija adyacente a la cavidad ventricular se mantiene conectada a la superficie de esta cavidad (y por lo general se mantienen como célula madre), mientras que la otra célula hija migra y se diferencia (Chenn y McConnell 1995; Hollyday 2001). El momento de esta división vertical es la última vez en que esta última célula se dividirá y es conocido como la **fecha de nacimiento** de la neurona. Diferentes tipos de neuronas y de células gliales tienen fecha de nacimiento a diferentes tiempos. La marcación a diferentes tiempos durante el desarrollo muestra que las células con las fechas de nacimiento más temprano migran distancias más cortas. Las células con fechas de nacimiento más tardías migran a través de estas capas para formar las regiones más superficiales de la corteza. La posterior diferenciación depende de las posiciones que estas neuronas ocupan una vez fuera del neuroepitelio germinal (Letourneau 1977; Jacobson 1991).

* *Nota del traductor:* "verticalmente" se refiere a que la orientación que tiene el huso mitótico es perpendicular a la cavidad ventricular (o lumen), por lo tano, luego de la división una de las células perderá el contacto con esta cavidad. "Horizontalmente" se refiere a que la orientación del huso mitótico es paralela a la cavidad ventricular y luego de la división ambas células hijas continuarán como células madre contactando con la cavidad.

Organización de la médula espinal y del bulbo raquídeo

A medida que las células adyacentes a la cavidad ventricular continúan dividiéndose, las células en migración forman una segunda capa alrededor del tubo neural original. Esta capa se vuelve progresivamente más gruesa cuando más células son agregadas a ésta desde el neuroepitelio germinal. Esta nueva capa es denominada la **zona del manto** (o **intermedia**), y el epitelio germinal es denominado ahora **zona ventricular** (y tardíamente el **epéndimo**) (fig. 12-15). Las células de la zona del manto se diferencian en neuronas y glía. Las neuronas hacen conexiones entre ellas y envían axones hacia adelante lejos de la cavidad ventricular, creando de este modo una **zona marginal** pobre en células. Finalmente, las células gliales cubren la mayor parte de los axones en la zona marginal con vainas de mielina, dándoles un aspecto blanquecino. Por lo tanto, la zona del manto, que contiene los cuerpos neuronales, con frecuencia es referida como la **sustancia gris**; la capa axonal marginal es a menudo denominada la **sustancia blanca**.

En la médula espinal y en el bulbo raquídeo, este patrón básico de tres zonas de capas ventricular (ependimaria), del manto y marginal es conservado a lo largo del desarrollo. La sustancia gris (manto) gradualmente se convierte en una estructura con forma de mariposa rodeada por sustancia blanca; y ambos llegan a ser recubiertos por tejido conectivo. A medida que el tubo neural madura, un surco longitudinal -el **surco limitante**- divide a éste en mitades dorsal y ventral. La porción dorsal recibe la aferencia de las neuronas sensoriales, mientras que la porción ventral está involucrada en llevar a cabo varias funciones motoras (fig. 12-16).

Organización cerebelosa

En el cerebro, la migración celular, la proliferación neu-

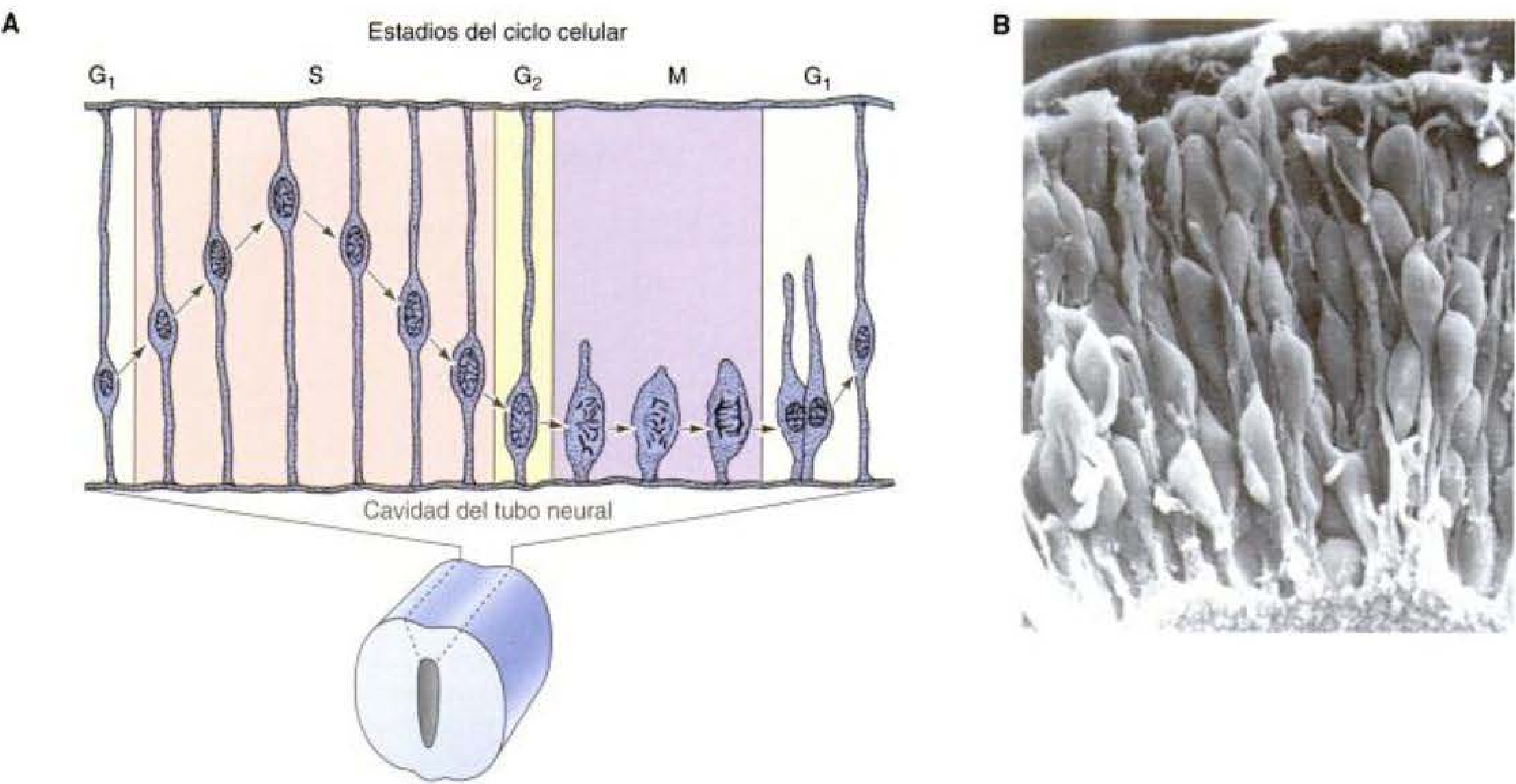


Fig. 12-14. A. Sección esquemática del tubo neural de un embrión de pollo, que muestra la posición del núcleo en una célula neuroepitelial como una función del ciclo celular. Las células mitóticas son halladas cerca de la superficie interna del tubo neural, adyacentes a la cavidad. B. Microfotografía electrónica de barrido de un tubo neural de pollo recién formado, que muestra células en estadios diferentes de sus ciclos celulares. (A, según Sauer 1935; B, cortesía de K. Tosney.)

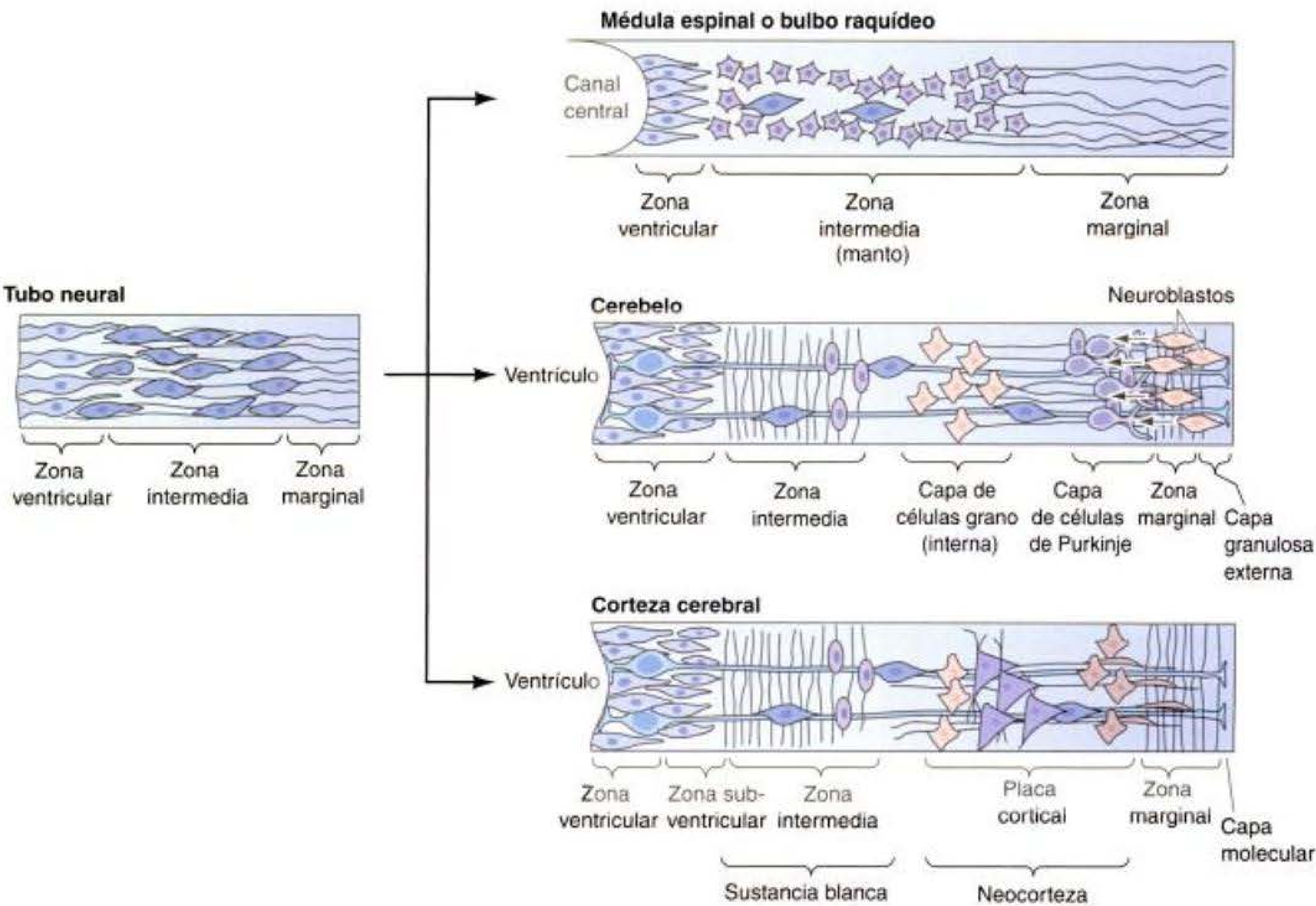


Fig. 12-15. Diferenciación de las paredes del tubo neural. Una sección de un tubo neural humano de 5 semanas (izquierda) revela tres zonas: ventricular (ependimaria), intermedia (manto) y marginal. En la médula espinal y en el bulbo raquídeo (fila superior), la zona ventricular se mantiene como la única fuente de neuronas y de células gliales. En el cerebelo (fila media), se forma una segunda capa mitótica, la capa granular externa, en la región más alejada de la zona ventricular. Los neuroblastos desde esta capa migran hacia la zona intermedia para formar la capa granular interna. En la corteza cerebral (fila inferior), los neuroblastos en migración y los glioblastos forman una placa cortical que contiene 6 capas. (Según Jacobson 1991.)

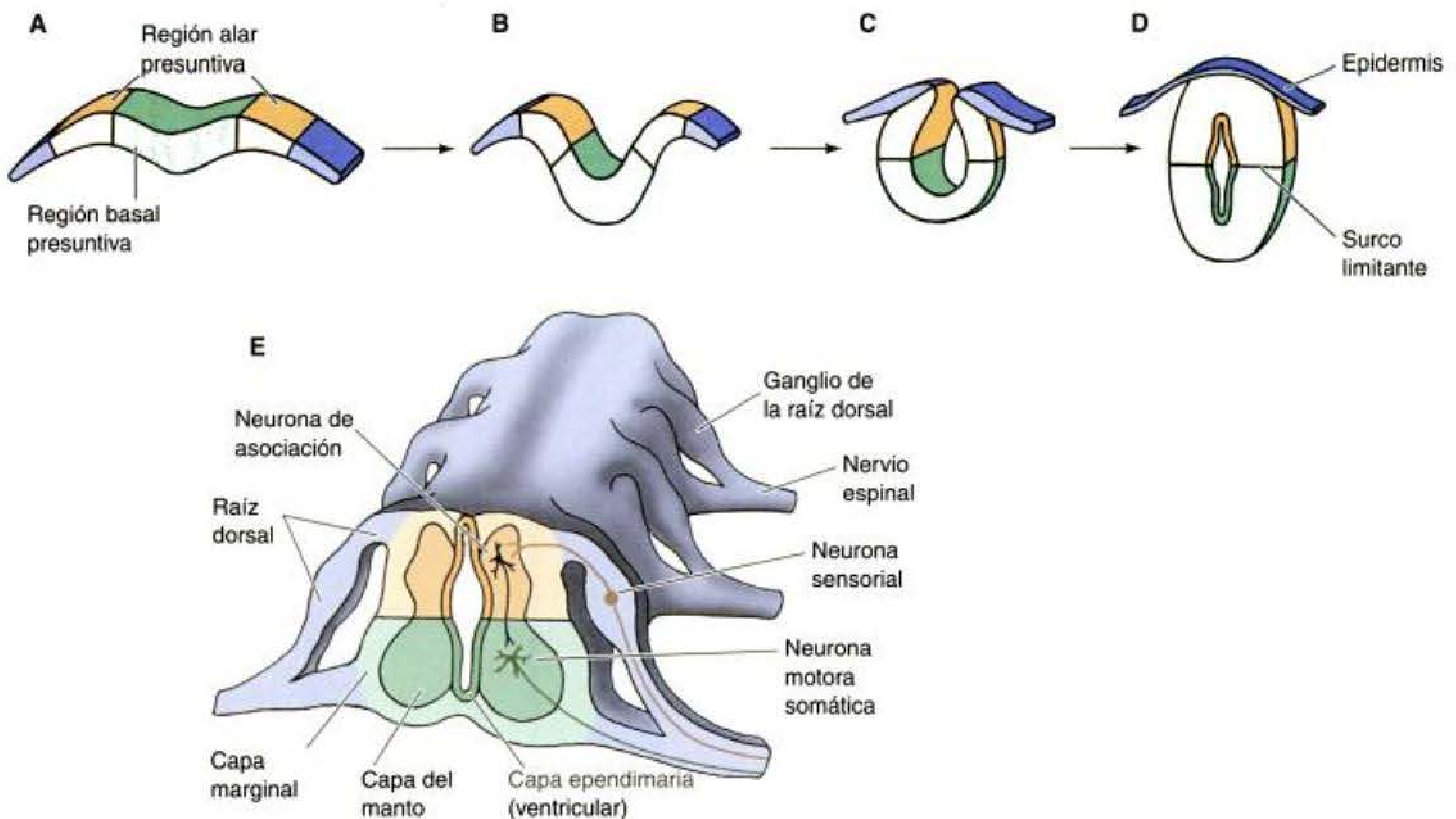


Fig. 12-16. Desarrollo de la médula espinal humana. **A-D.** El tubo neural es dividido funcionalmente en regiones dorsal (alar) y ventral (basal), separadas por el surco limitante. A medida que las células de los somitas adyacentes forman la columna vertebral, el tubo neural se diferencia en las capas ventricular (ependimaria), del manto y marginal y en las placas del techo y del piso. **E.** Segmento de la médula espinal con su raíz sensorial (dorsal) y motora (ventral). (Según Larsen 1993.)

ronal diferencial y la muerte celular selectiva producen modificaciones del patrón de tres zonas (véase fig. 12-15). En el cerebelo, algunos precursores neuronales entran a la zona marginal para formar grupos de neuronas denominados núcleos. Cada núcleo trabaja como una unidad funcional, sirve como una estación de relevo entre las capas externas del cerebelo y otras partes del cerebro. Otros precursores neuronales migran alejándose del epitelio germinal. Estos neuroblastos cerebelosos migran hacia la superficie externa del cerebelo en desarrollo y forman una nueva zona germinal, la **capa granulosa externa**, cerca del límite externo del tubo neural.

En el límite externo de la capa granulosa externa (que es de una a dos células de espesor), los neuroblastos proliferan y entran en contacto con células que están secretando factores BMP. Los BMP especifican los productos posmitóticos de estos neuroblastos para que lleguen a ser **neuronas grano o granulosas** (Alder y col. 1999). Estas neuronas grano migran hacia la zona ventricular (ependimaria), donde producen una región denominada **capa granulosa interna**. Mientras tanto, la zona ventricular original del cerebelo genera una amplia variedad de neuronas y de células gliales, incluidas las grandes y características **neuronas de Purkinje**, el principal tipo celular del cerebelo. Las neuronas de Purkinje secretan Sonic hedgehog, que mantiene la división de los precursores de las neuronas grano en la capa granulosa externa (Wallace 1999). Cada neurona de Purkinje tiene una enorme **arborización dendrítica** que se extiende como un árbol por arriba de un cuerpo parecido a un bulbo. Una neurona de Purkinje típica puede formar tanto como 100.000 conexiones (sinapsis) con otras neuronas, más que cualquier otro tipo de neurona estudiada. Cada neurona de Purkinje también emite un axón delgado, que conecta a las neuronas con los núcleos profundos del cerebelo.

Las neuronas de Purkinje son críticas en los senderos eléctricos del cerebelo. Todos los impulsos eléctricos finalmente regulan la actividad de estas neuronas, que son las únicas eferencias neuronales de la corteza cerebelosa. Para que esto suceda, las células apropiadas deben diferenciarse en los lugares y tiempos apropiados. ¿Cómo es que esto se lleva a cabo? El desarrollo de la organización espacial entre neuronas es crítico para el funcionamiento adecuado del cerebelo.

Un mecanismo que se piensa es importante para el posicionamiento de neuronas jóvenes dentro del cerebro de mamíferos en desarrollo es la **guía glial** (Rakic 1972; Hatten 1990). A lo largo de toda la corteza, se ve que las neuronas van sobre un "monorriel glial" hacia sus respectivos destinos. En el cerebelo, los precursores de las células grano viajan sobre los largos procesos de la **glía de Bergmann** (fig. 12-17; Rakic y Sidman 1973; Rakic 1975). Esta interacción neuronal-glial es una serie de acontecimientos compleja y fascinante, que involucran interacciones recíprocas entre glía y neuroblastos (Hatten 1990; Komuro y Rakic 1992). La neurona mantiene su adhesión a la célula glial a través de un número de proteínas, una de ellas es una proteína de adhesión denominada **astrotactina**. Si la astrotactina sobre una neurona

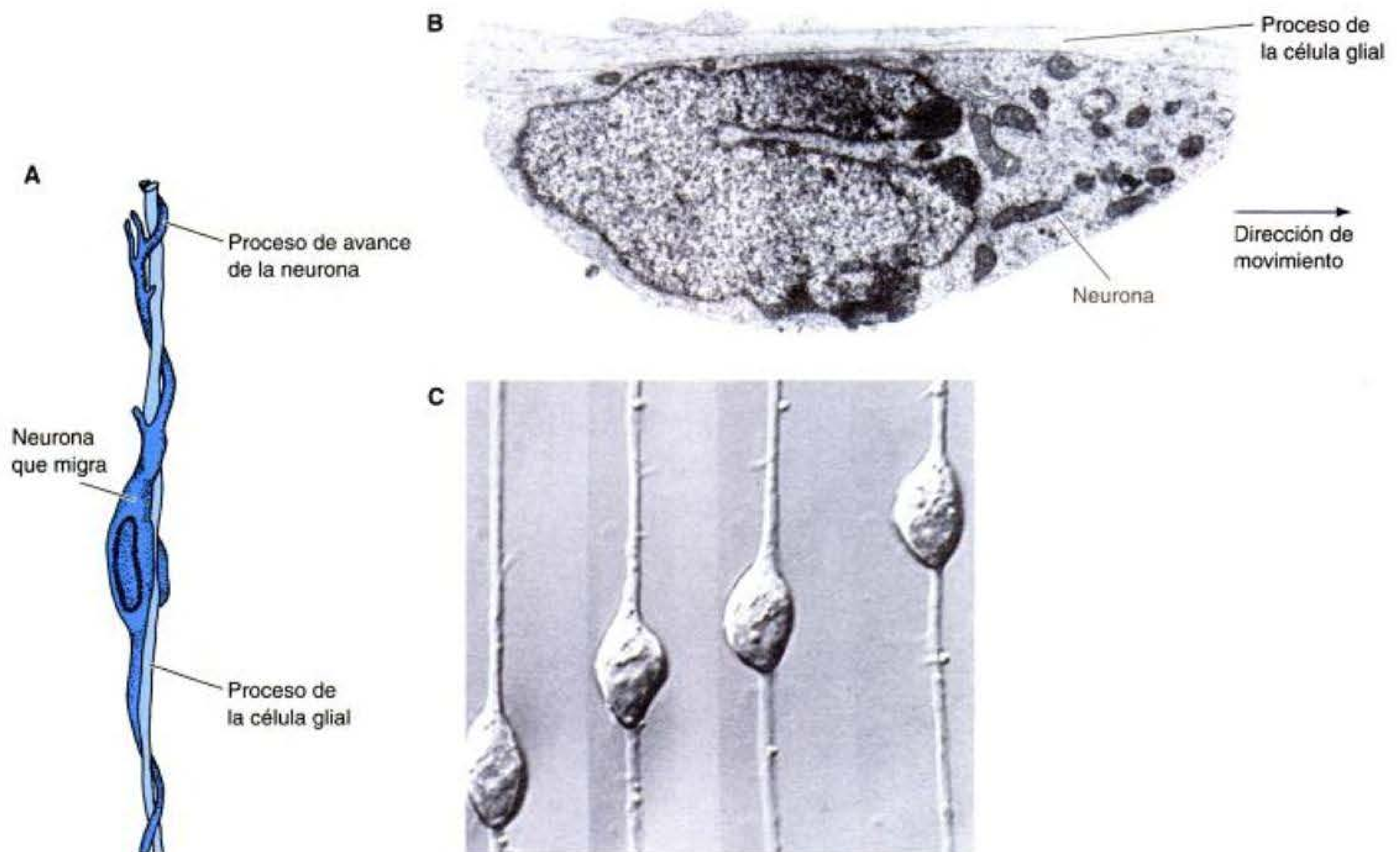


Fig. 12-17. Migración neuronal sobre los procesos de la célula glial. **A.** Diagrama de la migración de una neurona cortical sobre el proceso de una célula glial. **B.** Microfotografía electrónica de la región donde el cuerpo celular neuronal se adhiere al proceso glial. **C.** Microfotografías secuenciales de una neurona en migración sobre el proceso glial cerebelar. El proceso de avance tiene varias extensiones filopodiales. La neurona puede alcanzar una velocidad alrededor de 40 μm/h a medida que viaja sobre el proceso glial. (**A**, según Rakic 1975; **B**, de Gregory y col. 1988; **C**, de Hatten 1990; Microfotografías cortesía de M. Hatten.)

es enmascarada por anticuerpos contra la proteína, la neurona no puede adherirse a los procesos gliales (Edmondson y col. 1988; Fishell y Hatten 1991). Los ratones deficientes en astrotactina tienen velocidades de migración neuronal lentas, desarrollo anormal de la célula de Purkinje y problemas de coordinación de su equilibrio (Adams y col. 2002).

Gran parte de la comprensión de los mecanismos del ordenamiento espacial en el cerebro ha venido desde el análisis de las mutaciones neurológicas en ratones. Se conocen cerca de 30 mutaciones que afectan la organización de las neuronas del cerebelo. Muchos de estos mutantes cerebelosos han sido encontrados debido a que el fenotipo de tales mutantes –concretamente, la incapacidad para mantener el equilibrio mientras caminan– pueden ser fácilmente reconocidos. Por razones obvias, estas mutaciones reciben nombres como *weaver* (que se tambalea o zigzaguea), *reeler* (que se tambalea o da tumbos), *staggerer* (que se tambalea) y *waltzer* (que baila el vals).

SITIO WEB 12.7 **Mutaciones cerebelosas en el ratón (Cerebellar mutations of the mouse).** Las mutaciones en ratón que afectan la función cerebelosa han dado una destacable comprensión del modo en el que está construido el cerebelo. La mutación *reeler*, en particular, ha sido extremadamente importante en el conocimiento de cómo migran las neuronas cerebelosas.

Organización cerebral

La organización en tres zonas del tubo neural también es modificada en el cerebro. El cerebro está organizado de dos modos diferentes. En primer lugar, como el cerebelo, está organizado verticalmente en capas que interactúan entre sí (véase fig. 12-15). Ciertos neuroblastos de la zona del manto migran sobre procesos gliales a través de la sustancia blanca para generar una segunda zona de neuronas en la superficie externa del cerebro. Esta nueva capa de la sustancia gris llegará a ser la **neocorteza**. La neocorteza finalmente se estratifica en seis capas de cuerpos celulares neuronales (fig. 12-18); la formación de las capas del adulto no es completada hasta la mitad de la infancia. Cada capa de la neocorteza difiere de las otras en sus propiedades funcionales, en los tipos de neuronas allí encontrados y en el grupo de conexiones que son producidos. Por ejemplo, las neuronas en la capa 4 reciben la principal aferencia desde el tálamo (una región que se forma desde el diencéfalo), mientras que las neuronas en la capa 6 envían sus principales eferen-

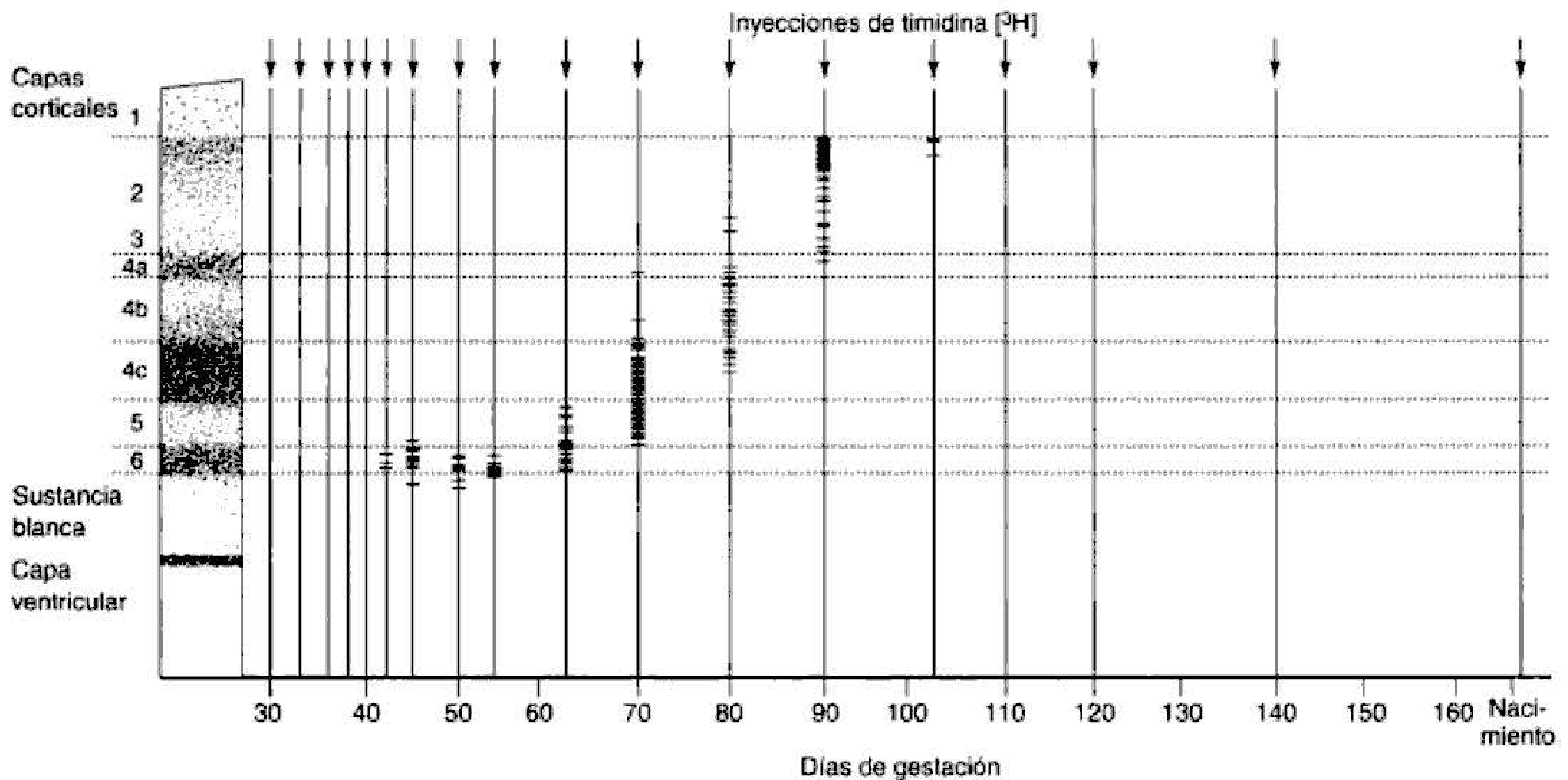


Fig. 12-18. Gradiente "adentro-afuera" de la formación de la corteza cerebral en el mono rhesus. Las "fechas de nacimiento" de las neuronas corticales fueron determinados por inyección intravenosa con timidina [^{3}H] en ciertos tiempos de la gestación. Las células fetales que experimentan la fase S o su ciclo de división celular final en el tiempo de la inyección fueron marcadas densamente. Cuando las neuronas marcadas habían "nacido," migraban hacia varias regiones corticales, donde fueron detectadas mediante la autorradiografía de las secciones cerebrales microscópicas. Se encontró que células marcadas a diferentes tiempos migraban a distintas regiones corticales. La figura representa las posiciones de las neuronas en las capas de la corteza visual. Las neuronas más jóvenes son halladas en la periferia de la corteza en desarrollo. La gestación completa en el mono rhesus es de 165 días. (Según Rakic 1974.)

cias hacia el tálamo.

En segundo lugar, la corteza cerebral está organizada horizontalmente en cerca de 40 regiones que regulan de manera anatómica y funcional distintos procesos. Por ejemplo, las neuronas en la capa 6 de la corteza visual proyectan al núcleo geniculado *lateral* del tálamo, que está involucrado en la visión (véase cap. 13), mientras que las neuronas de la capa 6 de la corteza auditiva (localizadas más anteriormente que la corteza visual) proyectan axones hacia el núcleo geniculado *medial* del tálamo, que funciona en la audición.

Ni la organización vertical ni la horizontal están especificadas clonalmente. En su lugar, la corteza en desarrollo se forma desde la mezcla de células derivadas de numerosas células madre. Después de su última mitosis, la mayoría de los neuroblastos generados en la zona ventricular migra hacia fuera a lo largo de los procesos gliales para formar la **placa cortical** en la superficie externa del cerebro. Como en el resto del cerebro, las neuronas que han nacido más temprano forman la capa más cercana al ventrículo. Las siguientes neuronas viajan grandes distancias para formar las capas más superficiales de la corteza. Este proceso forma un gradiente de desarrollo "adentro-fuera" (fig. 12-18; Rakic 1974). Una sola célula madre en la capa ventricular puede dar origen a neuronas (y células gliales) en cualquiera de las capas corticales (Walsh y Cepko 1988). Pero ¿cómo saben las células a qué capa deben ingresar?

McConnel y Kaznowski (1991) han demostrado que la determinación de la identidad laminar (es decir, a qué capa una célula migra) es producida durante la división celular final. Precursores neuronales recién generados trasplantados después de su última división desde cerebros jóvenes (donde deberían formar la capa 6) hacia cerebros más viejos cuyas neuronas migratorias están formando la capa 2, están comprometidos en sus destinos y migran solamente hacia la capa 6. Sin embargo, si estas células son trasplantadas antes de su división final (durante la mitad de la fase S), no están comprometidas y pueden migrar hacia la capa 2 (fig. 12-19).

Los destinos de los precursores neuronales desde cerebros más viejos están más fijos. Mientras que los precursores celulares formados tempranamente en el desarrollo tienen el potencial para llegar a ser cualquier neurona (en las capas 2 o 6, por ejemplo), las células precursoras tardías dan origen solamente a neuronas del nivel superior (capa 2) (Frantz y McConnell 1996). Una vez que las células llegan a sus destinos finales, se piensa que producen moléculas de adhesión particulares que las organizan como núcleos del cerebro (Matsunami y Takeichi 1995). Todavía no se conoce la naturaleza de la información dada a la célula cuando llega a ser comprometida.

SITIO WEB 12.8 **Construcción de la corteza cerebral (Constructing the cerebral cortex).** Recientemente se ha demostrado que son necesarios tres genes para la laminación apropiada del cerebro en los mamíferos. Estos genes parecen importantes para la migración neuronal cortical y cuando están mutados pueden producir retraso mental profun-

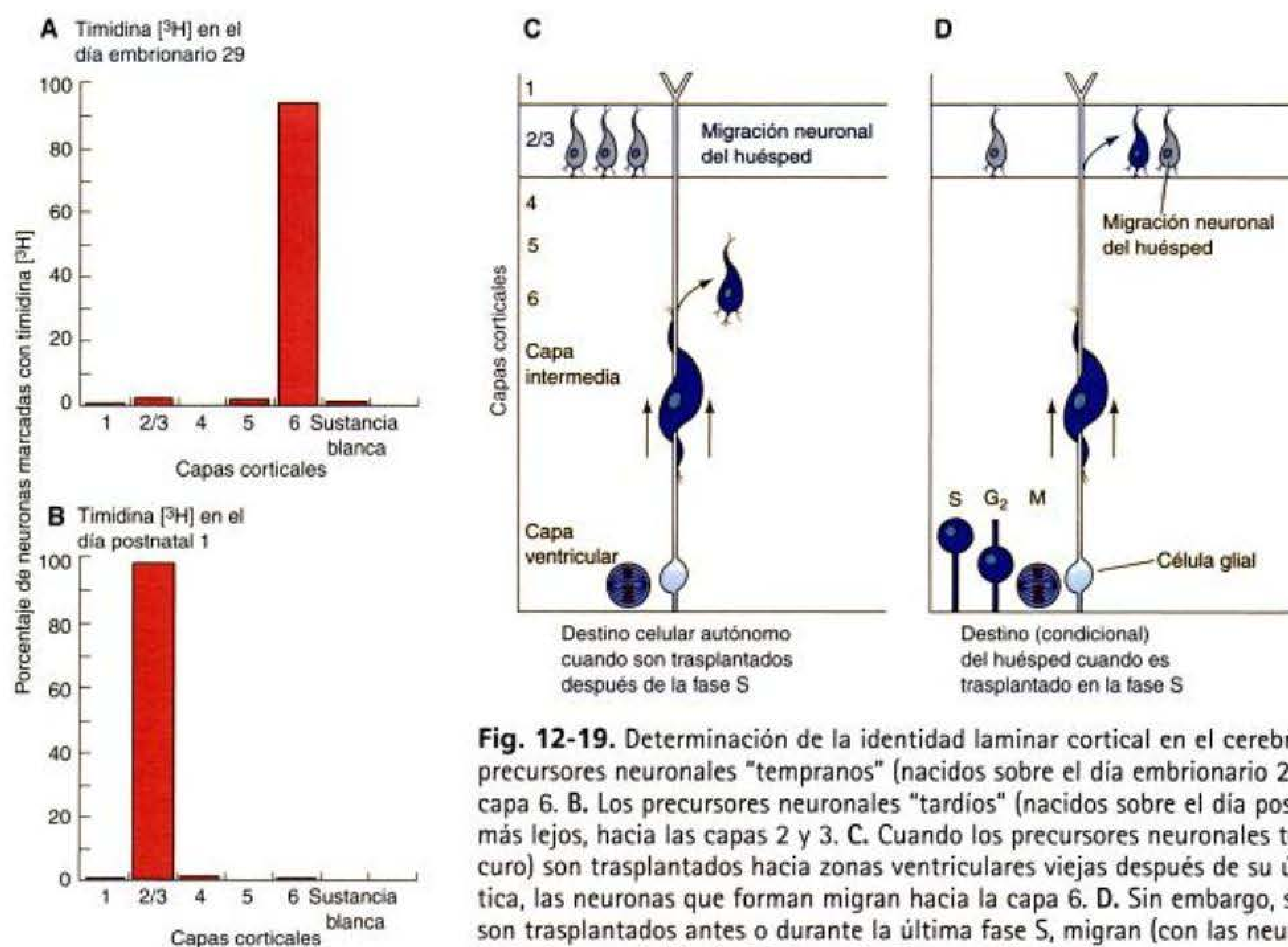


Fig. 12-19. Determinación de la identidad laminar cortical en el cerebro del hurón. **A.** Los precursores neuronales "tempranos" (nacidos sobre el día embrionario 29) migran hacia la capa 6. **B.** Los precursores neuronales "tardíos" (nacidos sobre el día posnatal 1) migran más lejos, hacia las capas 2 y 3. **C.** Cuando los precursores neuronales tempranos (azul oscuro) son trasplantados hacia zonas ventriculares viejas después de su última fase S mitótica, las neuronas que forman migran hacia la capa 6. **D.** Sin embargo, si estos precursores son trasplantados antes o durante la última fase S, migran (con las neuronas del huésped) hacia la capa 2. (Según McConnell y Kaznowski 1991.)

Información adicional y especulaciones

El desarrollo único del cerebro humano

El desarrollo de la neocorteza* humana es sorprendentemente plástico y "trabaja casi constantemente en progreso". Cualquier distinción de los seres humanos de otros primates debe residir en las características únicas del desarrollo humano, especialmente en el del cerebro. Han sido identificados al menos cinco fenómenos que distinguen al desarrollo del cerebro humano del de otras especies, incluidos otros primates.

1. La conservación de la velocidad de crecimiento neuronal fetal después del nacimiento.
2. La migración de las células desde el prosencéfalo hacia el diencéfalo.
3. La actividad de transcripción.
4. La forma específica del gen *FOXP2*.
5. La continuación de la maduración del cerebro en la vida adulta.

Velocidad de crecimiento neuronal fetal después del nacimiento

Si hay una característica importante que distingue a los humanos del resto del reino animal, es la conservación de la velocidad de crecimiento neural fetal. Como los cerebros humanos, los cerebros de los monos tienen una elevada velocidad de crecimiento antes del nacimiento. Sin embargo, después del nacimiento esta velocidad disminuye enormemente en los monos; en cambio, los seres humanos tienen un crecimiento cerebral rápido por cerca de dos años después del nacimiento (fig. 12-20A; Martin 1990). Durante el desarrollo posnatal temprano, se incorporan aproximadamente 250.000 neuronas por minuto (Purves y Lichtman 1985). La proporción de peso cerebral en relación con el peso corporal al nacer es también semejante para los grandes monos y el hombre. Sin embargo, para el momento en el que los seres humanos son adultos, la proporción está literalmente "fuera del gráfico" en 3,5 veces que la de los monos (fig. 12-20B; Bogin 1997).

A nivel celular, se halla que se forman no menos de 30.000 sinapsis por segundo por centímetro cuadrado de corteza durante los primeros años de vida humana. Se piensa que este aumento en el número de neuronas puede: 1) generar nuevos módulos (sitios) que pueden adquirir nuevas funciones, 2) almancenar nuevas memorias para utilizar en pensamientos y en pronosticar, y 3) permitir el aprendizaje mediante la interconexión entre ellas y con las neuronas generadas prenatalmente (Rose 1998; Barinaga 2003). Es en el estadio posnatal temprano que esta intervención puede aumentar el IQ (revisión en Wickelgren 1999).

Este estadio también considera la mayor parte de la maduración de los circuitos neurales determinados por el diámetro y la mielinización del axón.

* *Nota del traductor:* algunos autores dividen al telencéfalo en regiones palial y subpalial. La región palial a su vez es subdividida en palio medial, dorsal, lateral y ventral. La aquí denominada neocorteza se corresponde con el palio dorsal. Todos los vertebrados tienen palio dorsal aunque no todos alcanzan el desarrollo de una estructura con organización cortical claramente definida, razón por la cual para pensar en términos de anatomía comparada, el término necorteza no parece ser el más apropiado.

El ritmo prodigioso de producción continua de neuronas tiene importantes consecuencias. Portmann (1941), Gould (1977) y Montagu (1962) han afirmado que durante el primer año de nuestras vidas somos esencialmente fetos extrauterinos. Nuestra gestación real es de 21 meses si se sigue el gráfico de maduración del mono. En otras palabras, los humanos están a los 21 meses en lo que otros monos están al nacimiento. Nuestro "nacimiento prematuro" es un compromiso evolutivo entre el ancho de la pelvis materna y la circunferencia de la cabeza del recién nacido y la madurez pulmonar. El mecanismo para la conservación de la velocidad de crecimiento neural fetal ha sido denominada *hipermorfosis*: la extensión filética del desarrollo más allá de su estado ancestral (Vrba 1996).

SITIO WEB 12.9 **Crecimiento neuronal y la invención de la niñez (Neuronal growth and the invention of childhood).** Una hipótesis interesante afirma que los requerimientos calóricos de este cerebro en crecimiento necesitaron un nuevo estadio del ciclo de vida humano –niñez– por el cual el niño es alimentado activamente por los adultos.

Migración de células hacia el tálamo dorsal

La mayoría de las neuronas se mantiene dentro de la región del cerebro en la que fueron formadas. Sin embargo, en el cerebro humano (pero no en los cerebros de ratones y de monos), ciertas neuronas desde el telencéfalo migran hacia el diencéfalo. Aquí entran al tálamo, un área involucrada en la memoria y resolución de problemas que se ha vuelto sobre todo grande en el cerebro humano (fig. 12-21; Letinic y Rakic 2001). Las neuronas desde el telencéfalo parecen contribuir a las regiones talámicas que distribuyen información a la corteza cerebral de los lóbulos frontales. El tálamo humano en desarrollo atrae quimiotácticamente a las neuronas del telencéfalo, pero esta quimiotaxis no es observada en ratones. El crecimiento del tálamo como una "estación de relevo" que coordina funciones corticales puede ser una de las características distintivas del cerebro humano de la de aquellas de nuestros animales primos. La capacidad de esta región de atraer neuronas corticales recién cultivadas puede ayudar a explicar la posición única de la singularidad del cerebro humano.

Elevada actividad transcripcional

En 1975, Mary-Claire King y Allan Wilson demostraron que las proteínas del cerebro humano y del chimpancé eran, con limitaciones experimentales, idénticas. Pero mientras que casi el 99% de la identidad del genoma humano, del chimpancé y del bonobo puede sugerir que los tres estén clasificados como especies dentro del mismo género (Goodman 1999), las diferencias morfológicas y de conductas son enormes. A. C. Wilson (citado en Gibbons 1998) sugirió que la diferencia entre las especies podría residir en la *cantidad* de proteínas producidas desde sus genes, y ahora hay evidencia para esta hipótesis. Utilizando micromatrices, Enard y col. (2002a) hallaron que la cantidad y el tipo de genes expresados en los hígados y en la sangre humanos y de chimpancés eran verdaderamente muy semejantes. Sin embargo, los *cerebros* humanos producían cerca de cinco veces más de mRNA que los cerebros de chimpancés. Mientras que este hallazgo no puede descartar la existencia de mensajeros cerebrales específicos de los seres humanos,* proporciona evidencia de que cambios cuantitativos en la expresión génica pueden destacar algunas de nuestras capacidades.

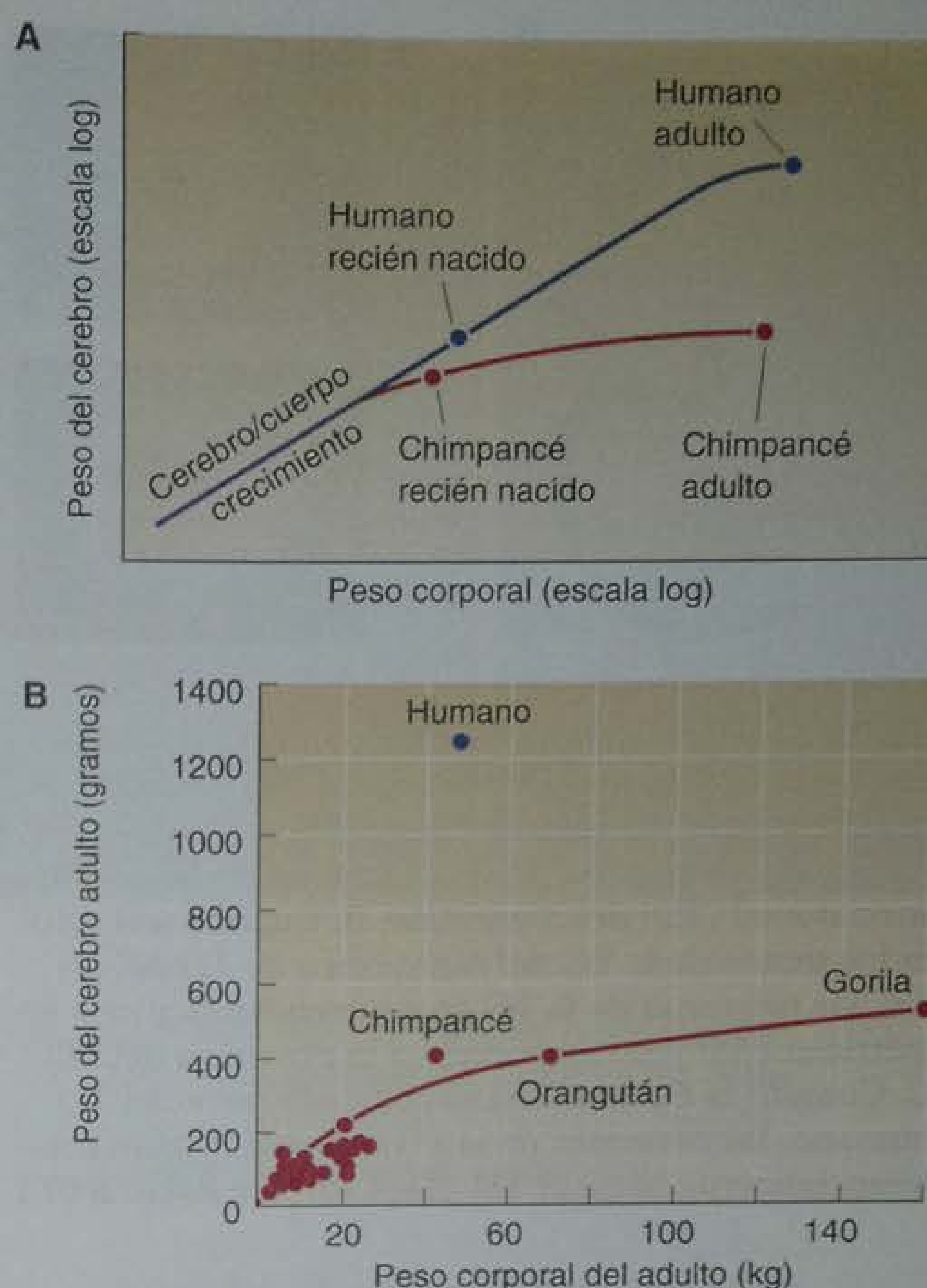


Fig. 12-20. Retención de la velocidad de crecimiento neuronal en el ser humano. **A.** Mientras que otros primates, como los chimpancés, completan su proliferación de neuronas cerca del momento del nacimiento, las neuronas de los seres humanos recién nacidos continúan proliferando a la misma velocidad que las neuronas del cerebro fetal. **B.** La proporción de cerebro/cuerpo humano (índice de encefalización) es cerca de 3,5 veces de la de los monos. (Según Bogin 1997.)

El gen FOXP2 como crítico para el habla y el lenguaje

El lenguaje hablado es una característica extraordinariamente humana y se supone que es un requisito esencial para la formación de las culturas. Tal lenguaje implica el control a una escala precisa de la laringe (la caja de la voz) y de la boca. Los individuos que son heterocigotas para las mutaciones en el locus *FOXP2* tienen severos problemas con la articulación del lenguaje y con la formación de las oraciones (Vargha-Khadem y col. 1995; Lai y col. 2001). Esta observación ha proporcionado a los antropólogos genéticos un interesante gen para estudiar. Enard y col. (2002b) han demostrado que, aunque este gen está extremadamente bien conservado a lo largo de la mayor par-

* Los seres humanos carecen de un gen funcional para el ácido citidina monofosfato-*N*-acetilneuramínico (CMP-NeuAc) hidroxilasa debido a una supresión de un exón de 92 pares de bases (Chou y col. 1998; Irie y col. 1998). El resultado es que uno de los hidratos de carbono más abundantes de la superficie celular de la mayoría de los animales, es reemplazado en humanos por el ácido *N*-acetilneuramínico. En el desarrollo neural, el ácido neuramínico tiene funciones en la adhesión del axón. Pero no han sido halladas todavía diferencias funcionales conocidas entre los dos tipos de ácidos neuramínicos con respecto al desarrollo. Esta diferencia genética específico de especie es una de tan solo unas pocas que han sido halladas entre los seres humanos y otros primates, aunque serán encontradas más probablemente cuando las micromatrices lleguen a ser utilizadas más ampliamente.

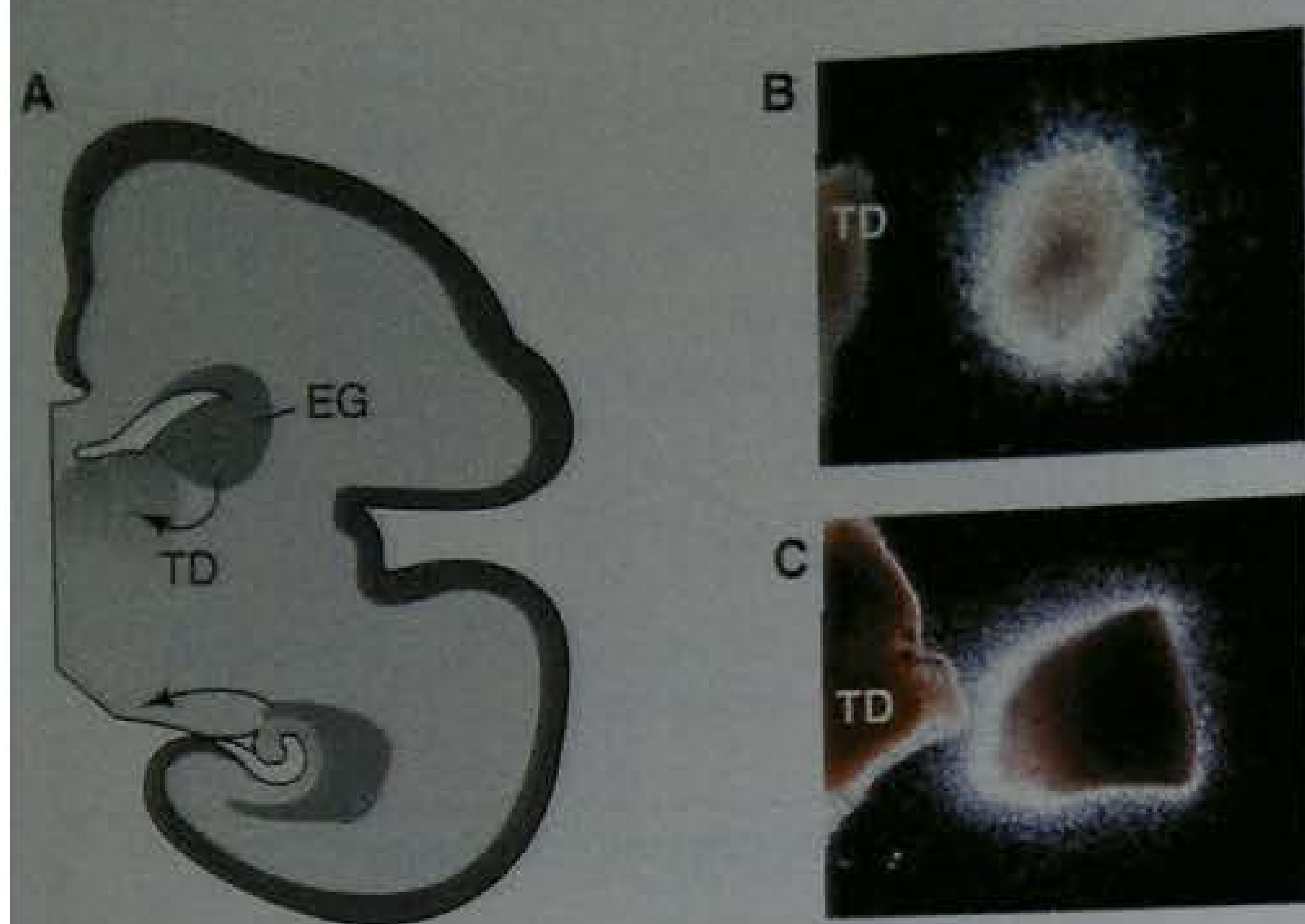


Fig. 12-21. Migración de las células desde el telencéfalo hacia el tálamo dorsal del diencéfalo. **A.** Ruta de migración, que muestra la vía de migración desde la eminencia ganglionar (EG) del telencéfalo hacia el tálamo dorsal (TD) del diencéfalo. **B.** Cuando son colocados trozos de la EG del ratón cerca de TD del ratón, las neuronas de la EG se mueven hacia afuera simétricamente y no responden a la presencia del TD. **C.** Cuando la EG humana es colocada cerca del TD humano, las neuronas de la EG humana migran preferencialmente hacia el TD. (De Letinic y Rakic 2001.)

te de la evolución de los mamíferos, éste tiene una forma única en los seres humanos. En efecto, el gen *FOXP2* humano ha acumulado dos mutaciones que cambian aminoácidos desde la divergencia del ancestro común de los humanos y de los chimpancés. Uno de estos cambios creó un nuevo sitio de fosoforilación. *Foxp2* en el ratón es expresado en el cerebro en desarrollo, pero su principal sitio de expresión es el pulmón (Shu y col. 2001). No se sabe si el cambio del aminoácido en el supuesto factor de transcripción le da a éste una nueva función en el sistema nervioso o si estos cambios estuvieron involucrados en la formación del lenguaje y en la cultura. Lo que es conocido es que esta proteína en este momento es crítica en la formación de nuestros movimientos orofaciales y en la gramática característica del lenguaje.

Los cerebros adolescentes: tendido de conexiones y desencadenamiento

Hasta hace poco, la mayoría de los científicos pensaba que después del crecimiento inicial de las neuronas durante el desarrollo fetal y en la niñez temprana, no había más períodos de proliferación neuronal rápida. Sin embargo, estudios de resonancia magnética (RM) han demostrado que el cerebro mantiene su desarrollo hasta alrededor de la pubertad y que no todas las áreas del cerebro maduran simultáneamente (Giedd y col. 1999; Sowell y col. 1999). Además, poco después de la pubertad, se detiene el crecimiento neuronal y se produce la poda. Este tiempo de poda se relaciona con el momento en el cual se hace difícil la adquisición de lenguaje. Hay también en este momento una onda de producción de mielina ("sustancia blanca" desde las células gliales que forman las vainas de los axones neuronales). La mielinización es crítica para el funcionamiento apropiado de las áreas neurales y las principales diferencias entre los cerebros de la pubertad temprana y los de la adultez temprana involucran a la corteza frontal (Sowell y col. 1999).

Estas diferencias en el desarrollo del cerebro pueden explicar las respuestas extremas que tienen los adolescentes a ciertos estímulos, además de su capacidad para aprender ciertas tareas. Cuando estudios funcionales de RM exploraron cerebros de sujetos en el momento en que eran mostrados sobre una pantalla de computadora retratos emocionales, los adolescentes jóvenes activaban la amígdala, un centro del cerebro que actúa de mediador en el miedo y en las emociones fuertes. Cuando se les mostraron los mismos retratos a los adolescentes más viejos la mayor parte de su actividad cerebral se centró en el lóbulo frontal, un área involucrada en percepciones más razonadas (Baird y col. 1999). El cerebro adolescente es muy complicado y es una entidad dinámica, y (como cualquier padre sabe) que no es fácilmente entendible. Pero si uno sobrevive a esos años, el cerebro resultante es capaz de producir decisiones razonadas, incluso ante el ataque violento de situaciones emocionales.

---

do en los seres humanos.

Células madre neurales adultas

Hasta hace poco tiempo, era una creencia generalizada que una vez que el sistema nervioso estaba maduro, no "nacían" nuevas neuronas. Las neuronas que se formaban en el útero y durante los pocos primeros años de la vida eran todo lo que se podría esperar alguna vez tener. Sin embargo, las buenas noticias de los estudios recientes es que el cerebro de mamíferos adultos es capaz de producir nuevas neuronas y que la estimulación ambiental puede aumentar el número de estas nuevas neuronas. En estos experimentos, los investigadores inyectaron ratones adultos, ratas o monos tití con bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleósido que se asemeja a la timidina. La BrdU será incorporada al DNA de la célula solo si la célula está experimentando la replicación del DNA; por lo tanto, cualquier célula marcada con BrdU debe haber experimentado la mitosis durante el tiempo que ésta fue expuesta a BrdU. Esta técnica de marcación demostró que cientos de neuronas estaban siendo producidas cada día en los mamíferos adultos. Además, estas nuevas células del cerebro se integraban con otras células del cerebro, tenían una morfología neuronal normal y presentaban potenciales de acción (fig. 12-22B; van Praag y col. 2002).

La inyección de humanos con BrdU no es normalmente ética, debido a que grandes dosis de BrdU son con frecuencia letales. Sin embargo, en ciertos pacientes con cáncer, el progreso de la quimioterapia es controlado por la transfusión de pacientes con una pequeña cantidad de BrdU. Gage y col. (Erikkson y col. 1998) tomaron muestras de autopsias de los cerebros de cinco pacientes que habían muerto entre los 16 y 781 días después de la infusión de BrdU. En los cinco sujetos, vieron nuevas neuronas en la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo (una parte del cerebro donde se puede formar la memoria). Las células marcadas con BrdU también se teñían para marcadores específicos de neuronas (fig.

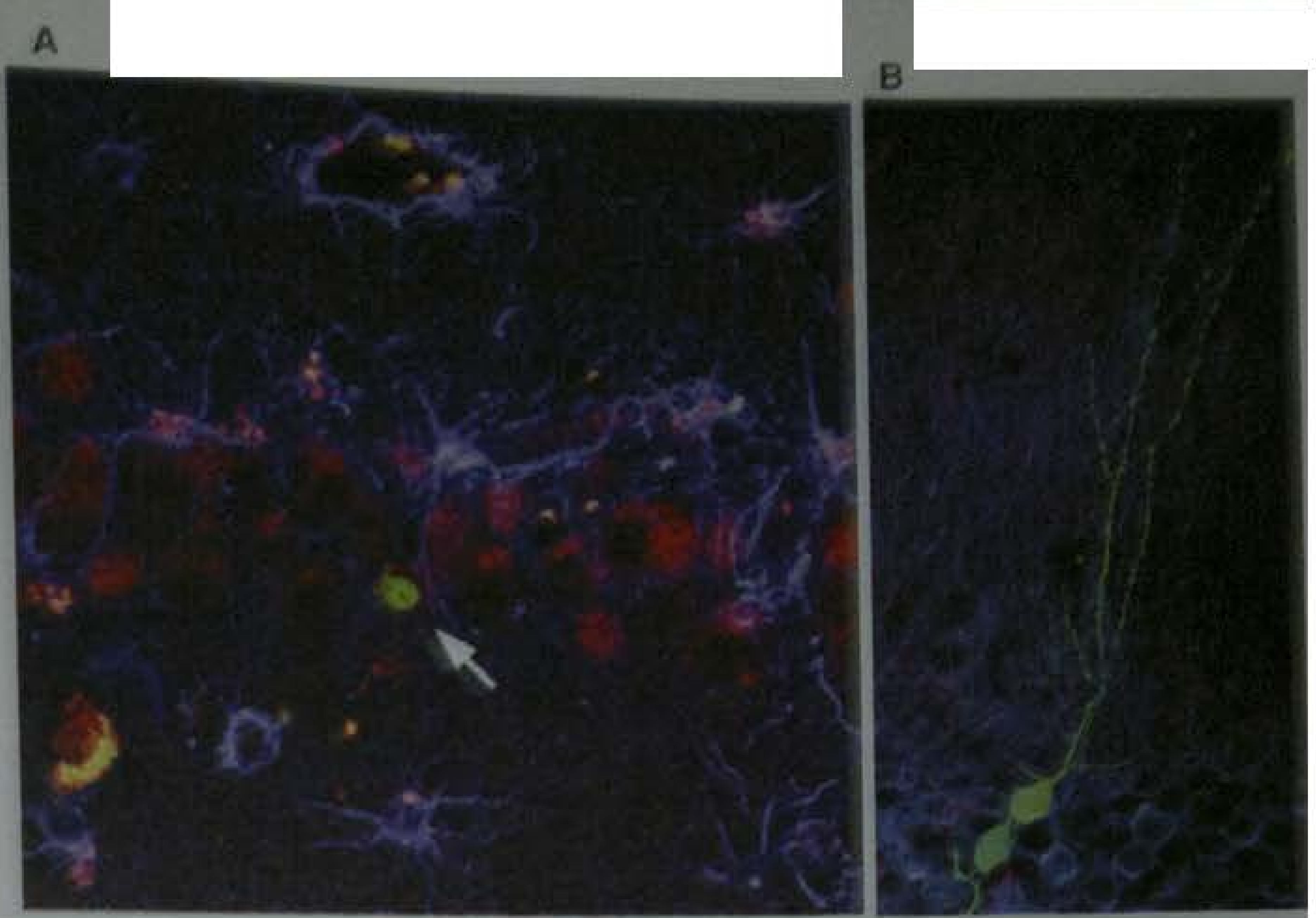


Fig. 12-22. Evidencia de células madre neurales adultas. **A.** Neurona recién generada en el cerebro humano del adulto. Esta célula está localizada en el giro dentado del hipocampo. La tinción verde, que indica células recién divididas, tiene una fluorescencia de un anticuerpo contra BrdU (un análogo de timidina que es tomado solo durante la fase S). La fluorescencia roja es de un anticuerpo que tiñe solo células neurales. Las células gliales son teñidas de violeta. La superposición de verde y rojo (flecha) muestra a una célula que es una neurona recién formada. **B.** Las neuronas de ratón adulto recién generadas tienen una morfología normal y reciben aferencias sinápticas. La célula verde es una neurona formada recientemente. Las manchas rojas son de sinaptofisina, una proteína hallada sobre las dendritas de las sinapsis de axones de otras neuronas. (A, de Erikksson y col. 1998, Microfotografía cortesía de F. H. Gage; B, de van Praag y col. 2002.)

12-22). Por lo tanto, aunque la velocidad de formación de nuevas neuronas en el adulto puede ser relativamente pequeña, el cerebro humano no es un hecho anatómico *consumado* en el nacimiento o incluso después de la infancia.

La existencia de células madre neurales en adultos es ahora bien establecida para el epitelio olfatorio (Kato y col. 2001) y parece probable que el hipocampo también pueda formar nuevas neuronas (Kempermann y col. 1997a,b; van Praag y col. 1999; Kornack y Rakic 1999). Parece que las células madre que producen estas neuronas están localizadas en el epéndimo (la antigua zona ventricular en donde las células madre neurales embrionarias una vez residieron) o en la zona subventricular adyacente a ésta (Doetsch y col. 1999; Johansson y col. 1999; Cassidy y Frisén 2001). Estas células madre neurales del adulto representan solo cerca del 0.3% de la población celular de la pared ventricular, pero pueden distinguirse de otras células mediante proteínas de superficie celular específicas (Rietze y col. 2001). Estas células madre pueden jugar un papel en el reemplazo de las neuronas muertas.* Durante el embarazo, la prolactina estimula la producción de células progenitoras neuronales en la zona subventricular del cerebro anterior del ratón adulto. Estos progenitores migran para producir neuronas olfatorias que pueden ser importantes para las conductas maternas para criar a la camada (Shingo y col. 2003). La existencia de tales células madre en la corteza es más polémica. Algunos investigadores (Gould y col. 1999a,b; Magavi y col. 2000) afirman haberlas encontrado; otros científicos (véase Rakic 2002) ponen en duda la existencia de estas células madre neurales corticales.

SITIO WEB 12.10 **Enfermedad de Parkinson (Parkinson disease).** El trasplante de células madre neurales fetales humanas ha sido utilizado para aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Mientras que esta terapia ha funcionado en algunas personas, ha exacerbado los síntomas en otros pacientes. Otros tipos de terapias, basados en células madre embrionarias y factores paracrinos, también están siendo analizados.

Diferenciación de las neuronas

El cerebro humano consiste en cerca de 10^{11} neuronas asociadas con cerca de 10^{12} células gliales. Las células que se mantienen como componentes esenciales del revestimiento del tubo neural se convierten en **células ependimarias***. Estas células dan origen a los precursores de las células neuronales y de la glía. Como se ha visto antes, se piensa que la diferenciación de estos precursores celulares está ampliamente determinada por el ambiente en el que ellos entran (Rakic y Goldman 1982) y que, al menos en algunos casos, una célula ependimaria dada puede dar origen a neuronas y glía (Turner y Cepko 1987).

El cerebro contiene una amplia variedad de tipos neuronales y gliales (como es evidente de la comparación de las células granulares relativamente pequeñas con las enormes neuronas de Purkinje). Las prolongaciones delgadas y ramificadas de la neurona que son utilizadas para recoger impulsos eléctricos desde otras células son denominadas **dendritas** (fig. 12-23). Algunas neuronas desarrollan solamente unas pocas dendritas, mientras que otras células (como las neuronas de Purkinje) desarrollan amplios árboles dendríticos. Muy pocas dendritas pueden hallarse sobre las neuronas corticales en el nacimiento, pero uno de los acontecimientos asombrosos del primer año de la vida humana es el aumento del número de estos procesos receptivos. Durante este año, cada neurona cortical desarrolla una superficie dendrítica suficiente para dar cabida a tanto como 100.000 sinapsis con otras

* El uso de células madre neuronales cultivadas para generar o reparar partes del cerebro será considerado en el capítulo 21.

* *Nota del traductor:* algunos autores denominan a este tipo celular como célula neuroepitelial, otros como células matriz o madre y otros como células ventriculares. Ellos prefieren reservar el término ependimaria para los tipos de células ya diferenciados (glial) que revisten la cavidad del mismo nombre.

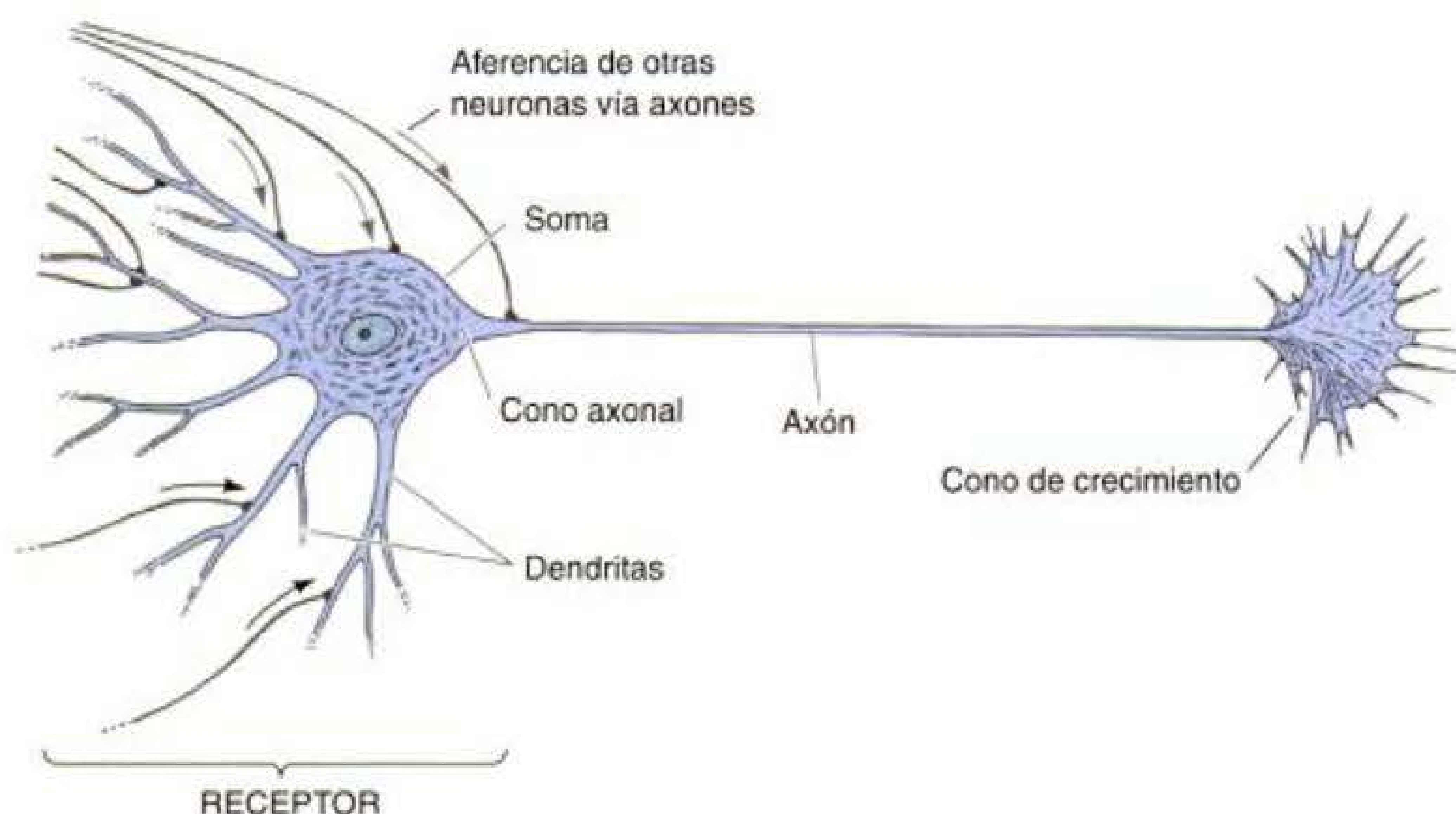


Fig. 12-23. Esquema de una neurona motora. Los impulsos eléctricos son recibidos por las dendritas y la neurona estimulada transmite impulsos a través de su axón (que puede ser de 0,6 a 0,9 centímetros de longitud) hacia el tejido blanco. El axón es el proceso celular a través del cual la neurona envía sus señales. El cono de crecimiento del axón es un aparato locomotor y sensorial. Éste explora activamente el ambiente y recoge las señales direccionales que le indican adónde ir. Finalmente formará una sinapsis con su tejido blanco.

neuronas. Una neurona cortical promedio conecta con otras 10.000 células neurales. Este patrón de sinapsis le permite a la corteza humana funcionar como centro para el aprendizaje, razonamiento y memoria, para desarrollar la capacidad para la expresión simbólica y para producir respuestas voluntarias a estímulos interpretados.

Otra característica importante de una neurona en desarrollo es su **axón** (a veces denominado **neurita**). Mientras que las dendritas son frecuentemente numerosas y no se extienden lejos del cuerpo celular neuronal, o **soma**, los axones pueden extenderse varios centímetros. Los receptores de dolor sobre el dedo grande del pie, por ejemplo, deben recorrer un largo camino para transmitir sus mensajes a la médula espinal. Uno de los conceptos fundamentales de la neurobiología es que el axón es una extensión continua del cuerpo celular de la neurona. A fines del siglo veinte, había muchas teorías que competían sobre la formación del axón. Theodor Schwann, uno de los fundadores de la teoría celular, creía que numerosas células neurales estaban unidas entre sí en una cadena para formar un axón. Víctor Hensen, el descubridor del nódulo, pensaba que el axón se formaba alrededor de hebras citoplasmáticas preexistentes entre las células. Wilhem His (1886) y Santiago Ramón y Cajal (1890) postularon que el axón era una extensión (aunque extremadamente larga) del soma neuronal. En 1907, Ross Harrison demostró la validez de esta teoría de la extensión en un elegante experimento que fundó tanto la ciencia de la neurobiología del desarrollo como la técnica del cultivo de tejidos. Harrison aisló una porción de tubo neural de un renacuajo de 3 mm. (En este estadio, poco después del cierre del tubo neural, no hay una diferenciación evidente de los axones.) Él colocó estos tejidos que contenían neuroblastos en una gota de linfa de rana sobre un cubreobjetos y lo invirtió colocándolo sobre un portaobjetos excavado. De este modo él pudo observar lo que estaba sucediendo en el interior de esta "gota colgante." Lo que Harrison vio fue que los axones surgían como extensiones de los neuroblastos, alargándose a casi 56 μm/h.

La extensión de la neurona es llevada a cabo por el extremo del axón, denominado el **cono de crecimiento** (fig. 12-24). El cono de crecimiento no avanza en línea recta, sino que "tantea" su camino a lo largo del sustrato. El cono de crecimiento se mueve por alargamiento y contracción de filopodios puntiagudos denominados **microespículas**. Estas microespículas contienen microfilamentos, que están orientados paralelos al eje longitudinal del axón. (Este mecanismo es semejante al observado en los microfilamentos de los filopodios de las células mesenquimáticas secundarias en equinodermos; véase cap. 8.) Tratando a las neuronas con citocalasina B se destruyen las microespículas de actina, inhibiendo su posterior

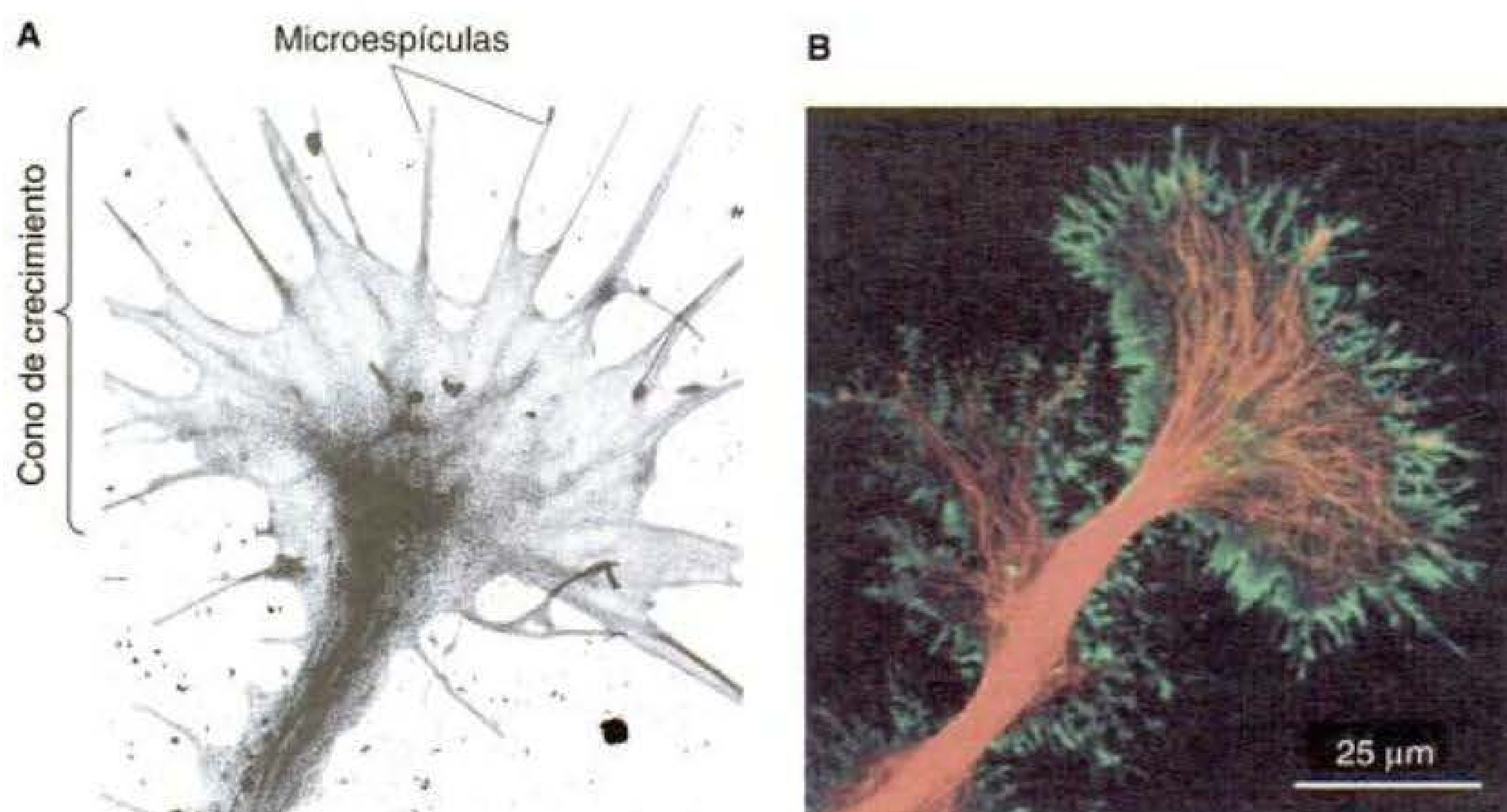


Fig. 12-24. Cono de crecimiento axonal. **A.** Microespículas de actina en un cono de crecimiento axonal, vistas por microscopia electrónica de transmisión. **B.** Cono de crecimiento del gusano del cuerno de tabaco *Manduca sexta* durante la extensión y exploración del axón. La actina en los filopodios está teñida de verde con faloidina fluorescente, mientras que los microtúbulos están teñidos de rojo con un anticuerpo fluorescente para tubulina. (**A**, de Letourneau 1979; **B**, cortesía de R. B. Levin y R. Luedemanan.)

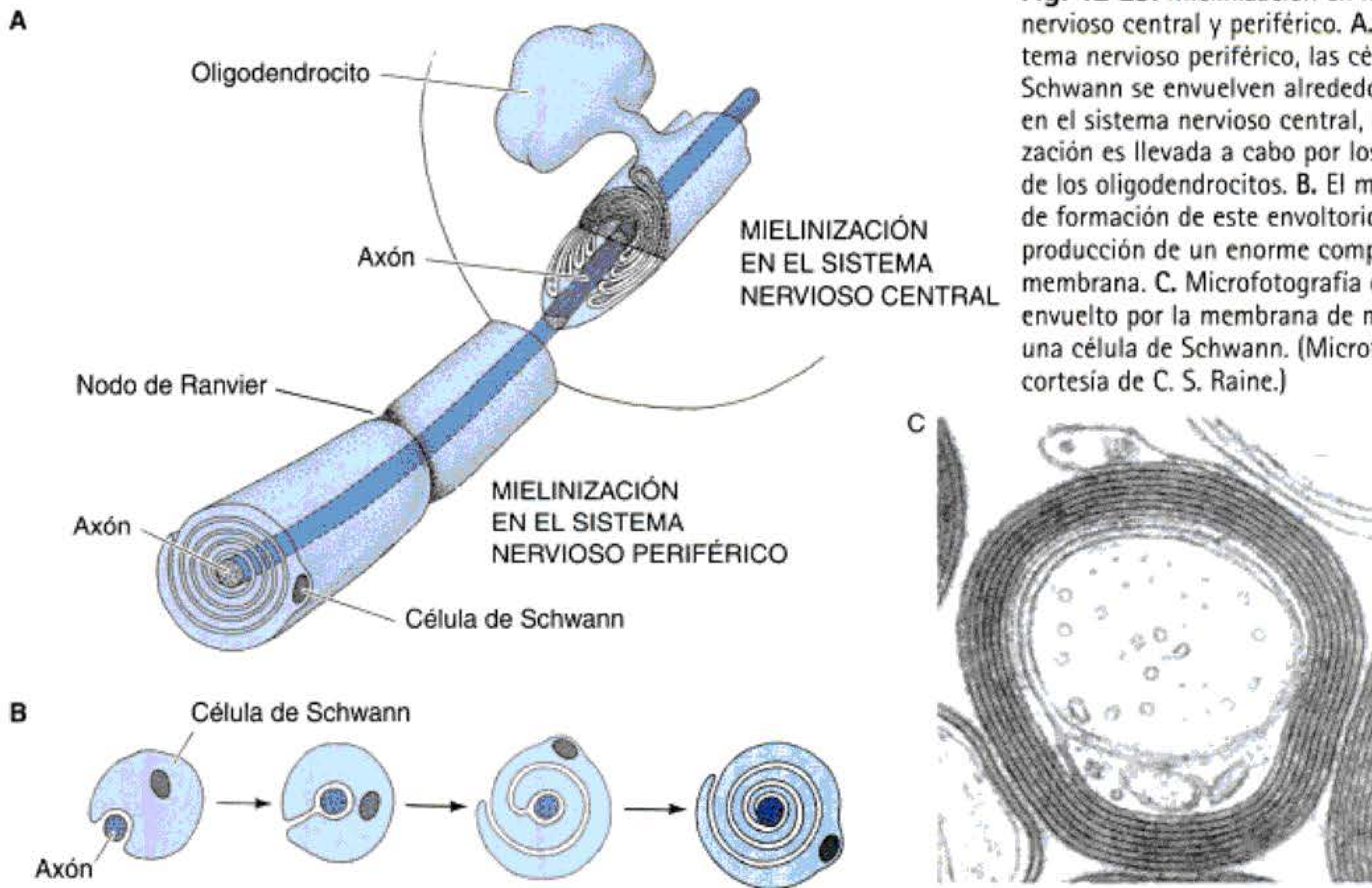


Fig. 12-25. Mielinización en los sistemas nervioso central y periférico. **A.** En el sistema nervioso periférico, las células de Schwann se envuelven alrededor del axón; en el sistema nervioso central, la mielinización es llevada a cabo por los procesos de los oligodendrocitos. **B.** El mecanismo de formación de este envoltorio implica la producción de un enorme complejo de membrana. **C.** Microfotografía de un axón envuelto por la membrana de mielina de una célula de Schwann. (Microfotografía cortesía de C. S. Raine.)

avance (Yamada y col. 1971; Forscher y Smith 1988). Dentro del mismo axón, el soporte estructural es proporcionado por microtúbulos y el axón se retraerá si la neurona es colocada en una solución de colchicina. Por lo tanto, la neurona en desarrollo retiene los mismos mecanismos que se han observado en los puntos bisagra dorsolaterales del tubo neural -es decir, alargamiento por los microtúbulos y cambios de la forma apical por los microfilamentos.

Como en la mayoría de las células migratorias, las microespículas del cono de crecimiento se enganchan al sustrato y ejercen una fuerza que tira el resto de la célula hacia delante. Los axones no crecerán si el cono de crecimiento fracasa en su avance (Lamoureux y col. 1989). Además de su papel estructural en la migración axonal, las microespículas también tienen una función sensorial. Abriéndose en abanico delante del cono de crecimiento, cada microespícula toma muestras del microambiente y envía las señales de nuevo al soma (Davenport y col. 1993). Como se verá en el capítulo 13, las microespículas son las organelas fundamentales involucradas en la exploración neuronal.

Las neuronas transmiten impulsos eléctricos de una región del cuerpo a otra. Estos impulsos con frecuencia van desde la dendrita hacia el soma, donde son concentrados hacia el axón. Para evitar la dispersión de la señal eléctrica y para facilitar su conducción hacia la célula blanco de interés, esta parte del axón es aislada a intervalos por células gliales. Dentro del sistema nervioso central, los axones son aislados a intervalos por procesos que se originan de un tipo de célula glial denominada **oligodendrocito.** El oligodendrocito se envuelve a sí mismo alrededor del axón, luego produce una membrana celular especializada denominada **vaina de mielina**. En el sistema nervioso periférico, un tipo celular glial denominado la **célula de Schwann** lleva a cabo esta mielinización (fig. 12-25). La vaina de mielina es esencial para la adecuada función neuronal y la desmielinización de las fibras nerviosas está asociada con convulsiones, parálisis y varias enfermedades debilitantes o letales (como esclerosis múltiple).

En el mutante de ratón *trembler* (que tiembla), las células de Schwann son incapaces de producir una proteína particular componente de la vaina de mielina, de modo tal que la mielinización es deficiente en el sistema nervioso periférico, pero normal en el sistema nervioso central. Contrariamente, en otro ratón mutante, denominado *jimpy*, el sistema nervioso central es deficiente en mielina, mientras que los nervios periféricos no están afectados (Sidman y col. 1964; Henry y Sidman 1988).

El axón también debe estar especializado para la secreción de neurotransmisores específicos a través de las pequeñas brechas (hendidura sináptica) que separan al axón de una célula de la superficie de su célula blanco (el soma, las dendritas, o el axón de una célula receptora o un sitio receptor sobre un órgano periférico). Algunas neuronas desarrollan la capacidad para sintetizar y secretar acetilcolina, mientras que otras neuronas desarrollan las vías o rutas enzimáticas para producir y secretar adrenalina, noradrenalina, octopamina, serotonina, ácido γ-aminobutírico (GABA), dopamina o algún otro neurotransmisor. Cada neurona debe activar los genes responsables de la producción de las enzimas que pueden sintetizar su

* La regeneración de neuronas y de sus axones será discutida en el capítulo 18. Las células gliales probablemente son muy importantes en permitir o evitar la regeneración del axón.

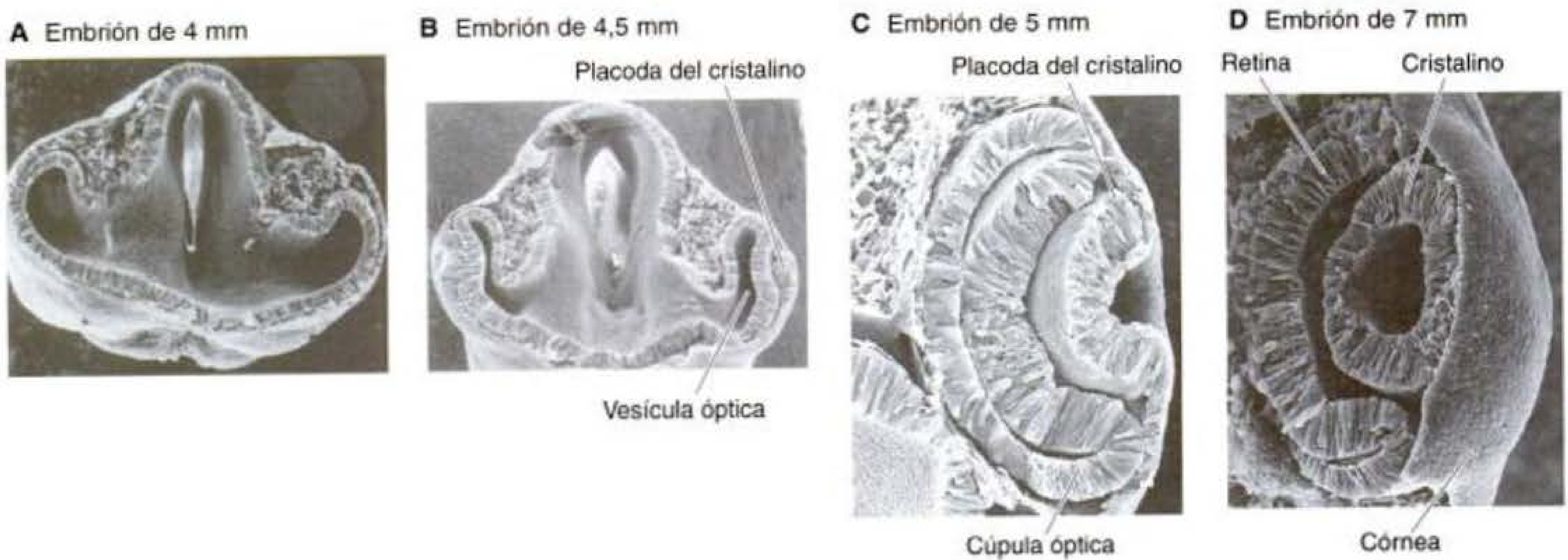


Fig. 12-26. Desarrollo del ojo en los vertebrados (véase además la fig. 6-5). **A.** La vesícula óptica se evagina del cerebro y contacta al ectodermo suprayacente, induciendo una placoda del cristalino. **B, C.** El ectodermo suprayacente se diferencia a células del cristalino a medida que la vesícula óptica se pliega sobre sí misma y la placoda del cristalino se convierte en la vesícula del cristalino. **C.** La vesícula óptica se convierte en la retina neural y pigmentaria a medida que el cristalino es internalizado. **D.** La vesícula del cristalino induce al ectodermo suprayacente a convertirse en la córnea (**A-C**, de Hilfer y Yang 1980, microfotografías cortesía de S. R. Hilfer; **D**, microfotografía cortesía de K. Tosney.)

neurotransmisor. Por lo tanto, el desarrollo neuronal involucra la diferenciación molecular y estructural.*

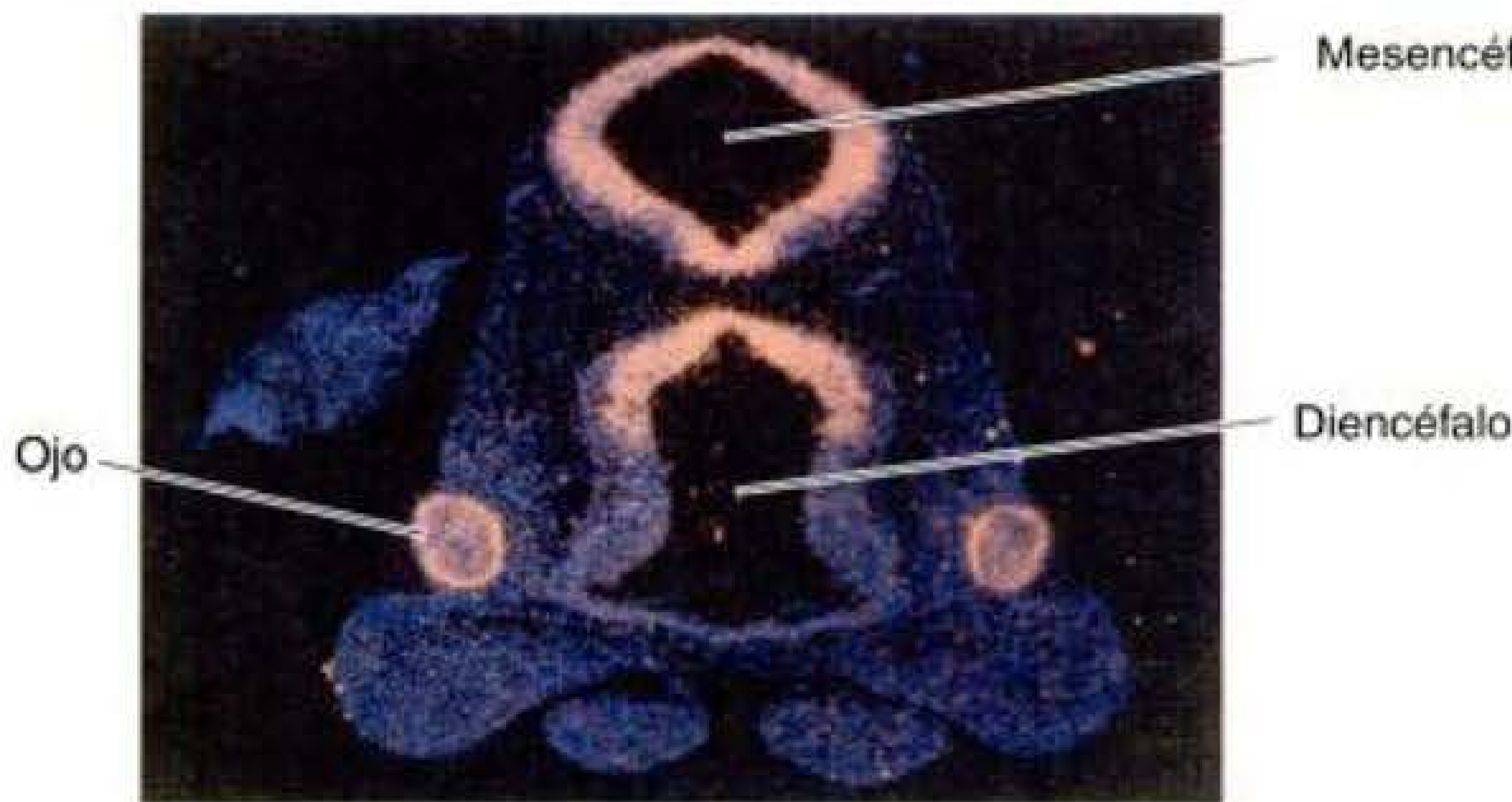
Desarrollo del ojo en los vertebrados

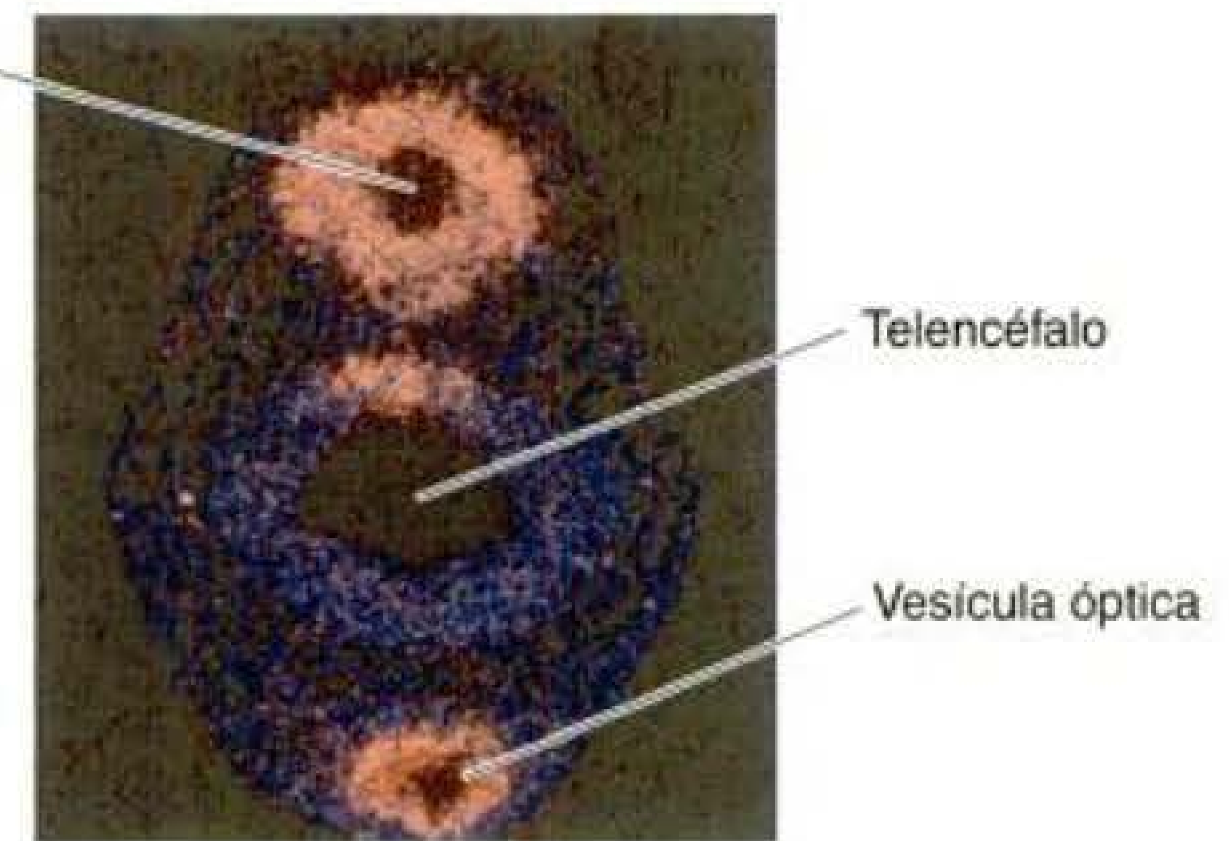
Un individuo conoce su entorno a través de sus órganos sensoriales. Los principales órganos sensoriales de la cabeza se desarrollan a partir de interacciones del tubo neural con una serie de engrosamientos epidérmicos denominadas las **placodas ectodérmicas craneales.** Las más anteriores de éstas son las dos **placodas olfatorias** que forman los ganglios para los nervios olfatorios, que son responsables del sentido del olfato. Las **placodas auditivas** de modo semejante se invaginan para formar el laberinto del oído interno, cuyas neuronas forman el ganglio acústico, que permite la audición. Esta sección, estará centrada en el ojo.

La dinámica del desarrollo óptico

La inducción del ojo fue discutida en el capítulo 6 y aquí solo será resumida (fig. 12-26). En la gastrulación, el endodermo en involución y el mesodermo interactúan con el ectodermo cefálico prospectivo adyacente para darle al ectodermo cefálico una tendencia para la formación de cristalino (Saha y col. 1989). Pero no todas las partes del ectodermo cefálico formarán finalmente cristalino y el cristalino debe tener una relación espacial precisa con la retina. La activación de la capacidad latente del ectodermo cefálico para formar cristalino y la localización del cristalino en relación con la retina son llevadas a cabo por la vesícula óptica. La vesícula óptica se extiende desde el diencéfalo y donde ésta se encuentra con el ectodermo cefálico, induce la formación de una placoda cristaliniana (o placoda del cristalino), que luego se invagina para formar el cristalino. La vesícula óptica se convierte en la cúpula óptica, cuyas dos capas se diferencian de distintos modos. Las células de la capa externa producen el pigmento melanina (siendo uno de los pocos tejidos además de las células de la cresta neural que pueden formar este pigmento) y finalmente llegan a ser la retina pigmentaria. Las células de la capa interna proliferan rápidamente y generan una variedad de glía, células ganglionares, interneuronas y neuronas fotorreceptoras sensibles a la luz. Colectivamente, estas células constituyen la retina neural. Las células ganglionares de la retina son neuronas cuyos axones envían impulsos eléctricos hacia el cerebro. Sus axones se encuentran en la base del ojo y viajan abajo hacia el pedículo óptico, que luego es denominado el nervio óptico.

Pero ¿cómo es que una región específica del ectodermo neural se informa que llegará a ser la vesícula óptica? Parece que un grupo de factores de transcripción -Six3, Pax6 y Rx1- son expresados conjuntamente en el extremo más anterior de la placa neural. Este dominio único posteriormente se separará en regiones bilaterales que formarán las vesículas ópticas. Nuevamente, se observan semejanzas entre la Drosophila y el sistema nervioso de los vertebrados, estas tres proteínas también son necesarias para la formación del ojo de Drosophila. Como se discutió en los capítulos 5 y 6, la proteína Pax6 parece ser especialmente importante en el desarrollo del cristalino y de la retina. En efecto, ésta parece ser un denominador común para las células fotorreceptoras en todos los phila. Si el gen Pax6 de ratón es insertado en el genoma de Drosophila y es activado al azar, los ojos de *Drosophila* se forman en las células donde está siendo expresado Pax6 de ratón (véase el cap. 23; Halder y col. 1995). Mientras que Pax6 también es expresado en el cerebro anterior, el cerebro posterior (rombencéfalo) y las placodas nasales murinas, los ojos parecen ser los más sensibles a su ausencia. Los humanos y ratones, Pax6 heterocigotas tienen ojos pequeños, mientras que los ratones y humanos homocigotas (y la *Drosophila*) carecen





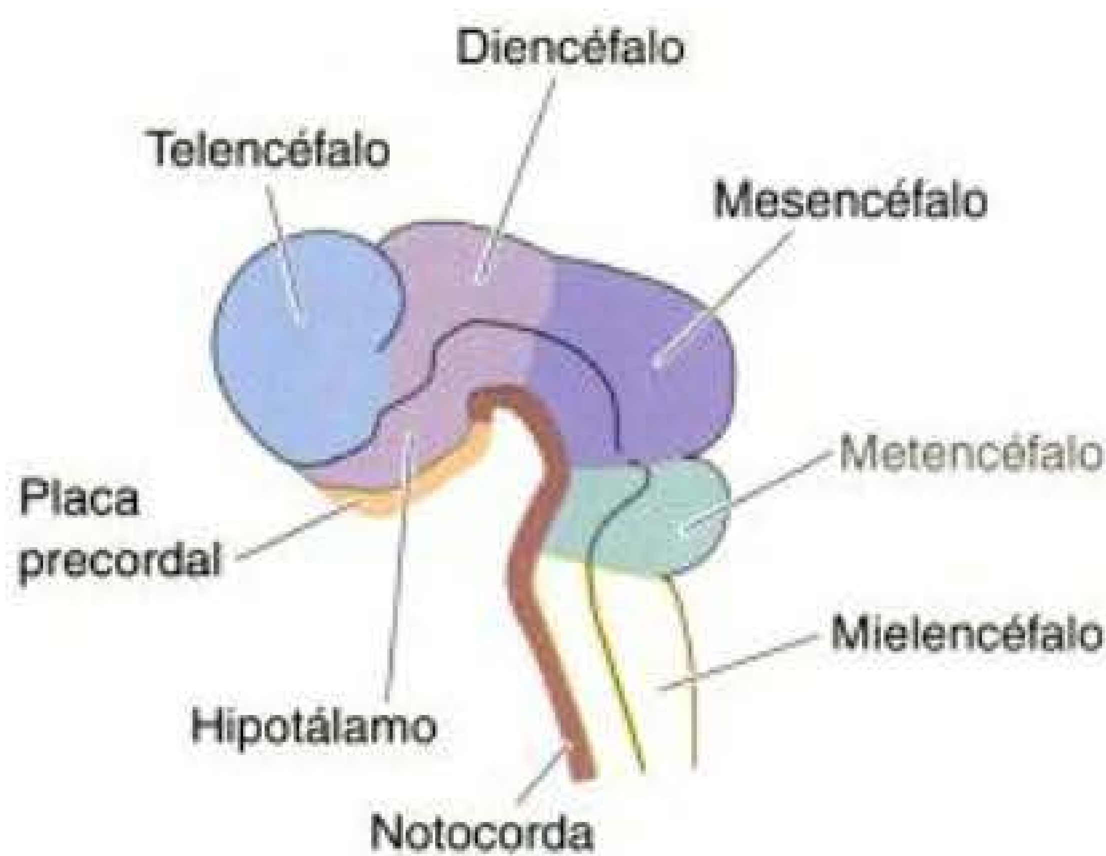


Fig. 12-27. Sonic hedgehog separa el campo ocular en dos campos bilaterales. **A.** Un embrión tipo salvaje a los 12,5 días y **B**, un embrión de 12,5 días que carece de Sonic hedgehog. La expresión del gen *Otx2*, vista en rojo, destaca ciertas regiones cerebrales. En el mutante, no se forma línea media y hay una única vesícula óptica continua en la región ventral. La nariz se formará por arriba de ésta. **C.** Dibujo que muestra la localización de la placa precordal en el embrión de ratón de 12 días. (Microfotografías cortesía de P. A. Beachy y C. Chiang.)

completamente de ojos (Jordan y col. 1992; Glaser y col. 1994; Quiring y col. 1994).

La separación del campo ocular único en dos campos bilaterales depende de la secreción de Sonic hedgehog. Si el gen sonic hedgehog es mutado, o si se inhibe el procesamiento de su proteína, el campo ocular medio único no se separará. El resultado es la ciclopía: un ojo único en el centro de la cara (y en general por debajo de la nariz) (fig. 12-27; véase además fig. 6-26; Chiang y col. 1996; Kelley y col. 1996; Roessler y col. 1996). Se piensa que la proteína Sonic hedgehog desde la placa precordal suprime la expresión de Pax6 en el centro del embrión y divide el campo en dos. El fenómeno de la ciclopía humana también involucra a Sonic hedgehog y será discutido en el capítulo 22.

Diferenciación de la retina neural

Como en la corteza del cerebro y en la del cerebelo, la retina neural se desarrolla en una disposición en capas de diferentes tipos neuronales (fig. 12-28). Estas capas incluyen a las células fotorreceptoras sensibles a la luz y al color (bastones y conos), a los cuerpos celulares de las células ganglionares, y a las interneuronas bipolares que transmiten los estímulos eléctricos desde los bastones y los conos hacia las células ganglionares Además, la retina contiene numerosas células gliales de Müller que mantienen su integridad, así como neuronas amácrinas (que carecen de axones grandes) y neuronas horizontales que transmiten impulsos eléctricos en el plano de la retina.

En los estadios tempranos del desarrollo de la retina, la división celular en la capa germinal y la migración y muerte diferencial de las células resultantes forman el patrón laminar estriado de la retina. La formación de este tejido altamente estructurado es uno de los problemas de la neurobiología del desarrollo más intensamente estudiados. Se ha demostrado (Turner y Cepko 1987) que una única célula precursora de neuroblasto de la capa germinal de la retina puede dar origen al menos a tres tipos de neuronas o a dos tipos de neuronas y a una célula glial. Este análisis fue llevado a cabo con el uso de una ingeniosa técnica para marcar las células generadas por un precursor particular de neuroblasto. Las ratas recién nacidas (cuyas retinas todavía estaban desarrollándose) fueron inyectadas en el dorso de sus ojos con un virus que podía integrarse en su DNA. Este virus contenía un gen para β-galactosidasa (no presente normalmente en la retina de la rata) que podría expresarse solamente en las células infectadas. Un mes después que los ojos de las ratas fueron infectados, las retinas fueron extirpadas y teñidas para la presencia de β-galactosidasa. Solamente fue teñida de azul la progenie de células infectadas. La figura 12-29 muestra a una tira de células derivadas de un precursor infectado. La tinción puede verse en cinco bastones, una neurona bipolar y una célula glial de Müller.

Diferenciación del cristalino y de la córnea

A medida que se desarrolla hacia cristalino, la placoda cristaliniana se redondea y contacta con el nuevo ectodermo suprayacente. La vesícula del cristalino induce entonces al ectodermo a formar la córnea transparente. Aquí, los parámetros físicos juegan un papel importante en el desarrollo del ojo. La presión de líquido intraocular es necesaria para la curvatura correcta de la córnea de modo tal que la luz pueda ser enfocada sobre la retina. La importancia de esta presión puede demostrarse experi-

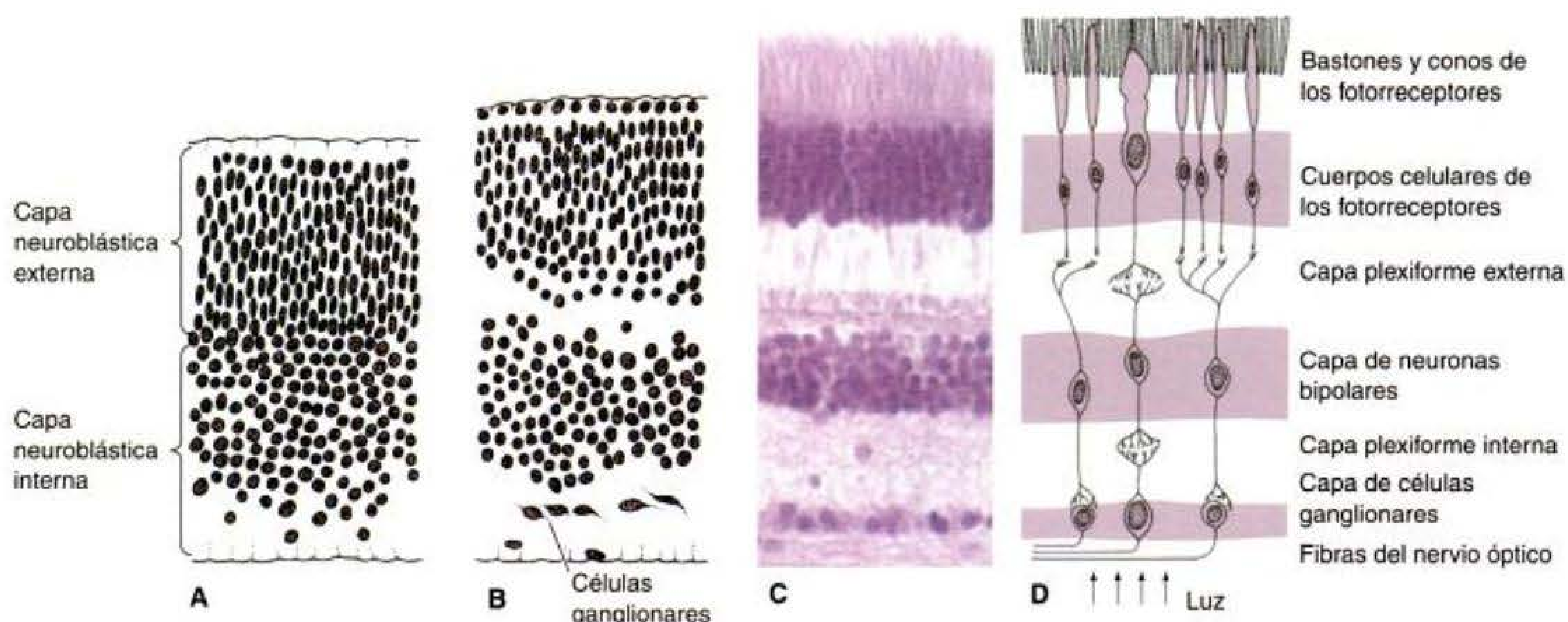


Fig. 12-28. Desarrollo de la retina humana. Las neuronas de la retina se segregan en capas funcionales durante el desarrollo. **A, B.** Separación inicial de los neuroblastos dentro de la retina. **C.** Las tres capas de neuronas en la retina adulta y las capas de sinapsis entre ellas. **D.** Representación funcional de las principales vías neuronales en la retina. La luz atraviesa las capas hasta que es recibida por los fotorreceptores. Los axones de los fotorreceptores hacen sinapsis con las neuronas bipolares, que transmiten señales eléctricas hacia las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares se unen para formar el nervio óptico, que ingresa en el cerebro. (A y B, según Mann 1964; C, microfotografía cortesía de G. Grunwald.)

mentalmente: la córnea no desarrollará su curva característica si se inserta un tubo de vidrio a través de la pared de un ojo de pollo en desarrollo para extraer el líquido intraocular (Coulombre 1956; 1965). La presión intraocular se mantiene mediante un anillo de huesos esclerales (probablemente derivados de la cresta neural), que actúan como contenedores inelásticos.

La diferenciación del tejido del cristalino hacia una membrana transparente capaz de dirigir la luz hacia la retina involucra cambios en la estructura y la forma celulares; además implica la síntesis de proteínas transparentes específicas del cristalino denominadas cristalinas (fig. 12-30). Las células en la porción interna de la vesícula del cristalino se alargan y bajo la influencia de la retina neural, se convierten en las fibras del cristalino (Piatigorsky 1981). A medida que las fibras continúan creciendo, ellas sintetizan cristalinas, que finalmente llenan la célula y originan la extrusión del núcleo. Las fibras que sintetizan cristalina finalmente llenan el espacio entre las dos capas de la vesícula cristaliniana. Las células anteriores de la vesícula cristaliniana constituyen un epitelio germinal, que sigue dividiéndose. Estas células en división se mueven hacia el ecuador de la vesícula y a medida que ellas pasan a través de la región ecuatorial, también comienzan a alargarse (fig. 12-30D). Por lo tanto, el cristalino contiene tres regiones: una zona anterior de células epiteliales en división, una zona ecuatorial de elongación celular y las zonas posterior y central de células fibrosas que contienen cristalina. Esta organización persiste durante toda la vida del animal como fibras que van desprendiéndose continuamente. En el pollo adulto, los procesos de diferenciación desde una célula epitelial a

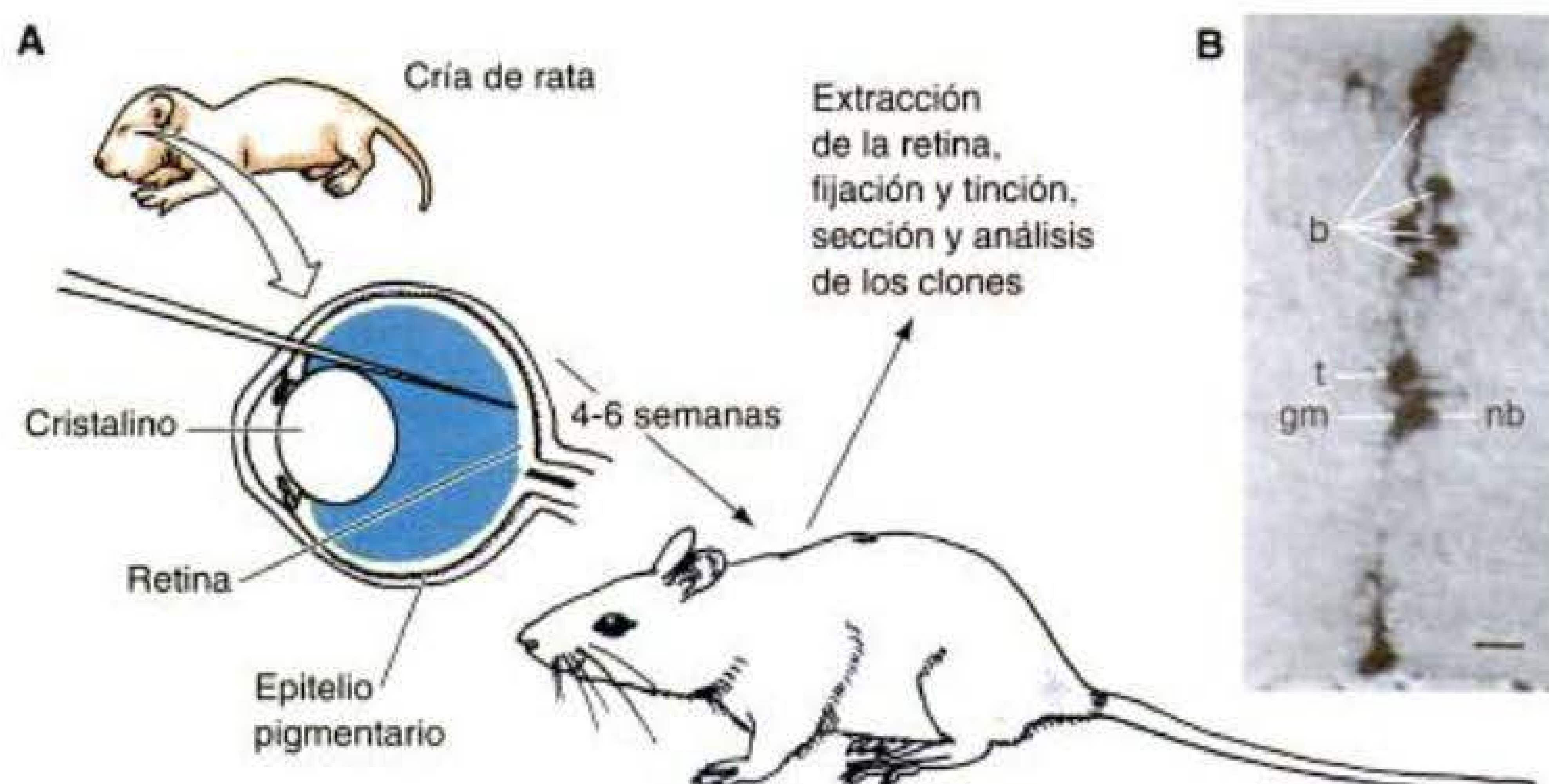


Fig. 12-29. Determinación del linaje de un neuroblasto en la retina de la rata. **A.** Técnica por medio de la cual un virus que contiene un gen funcional para β-galactosidasa es inyectado en el dorso del ojo de una rata recién nacida para infectar algunos de los precursores celulares de la retina. Después de un mes a 6 semanas, el ojo es extirpado y la retina es teñida para la presencia de β-galactosidasa. **B.** Las células teñidas forman un tira a través de la retina neural, que incluyen cinco bastones (b), una neurona bipolar (nb), un bastón terminal (t) y una célula glial de Müller (gm). Las identidades de estas células fueron confirmadas por el microscopio de contraste de fase de Nomarski. (Barra de escala, 20 µm.) (De Turner y Cepko 1987; microfotografía cortesía de D. Turner.)

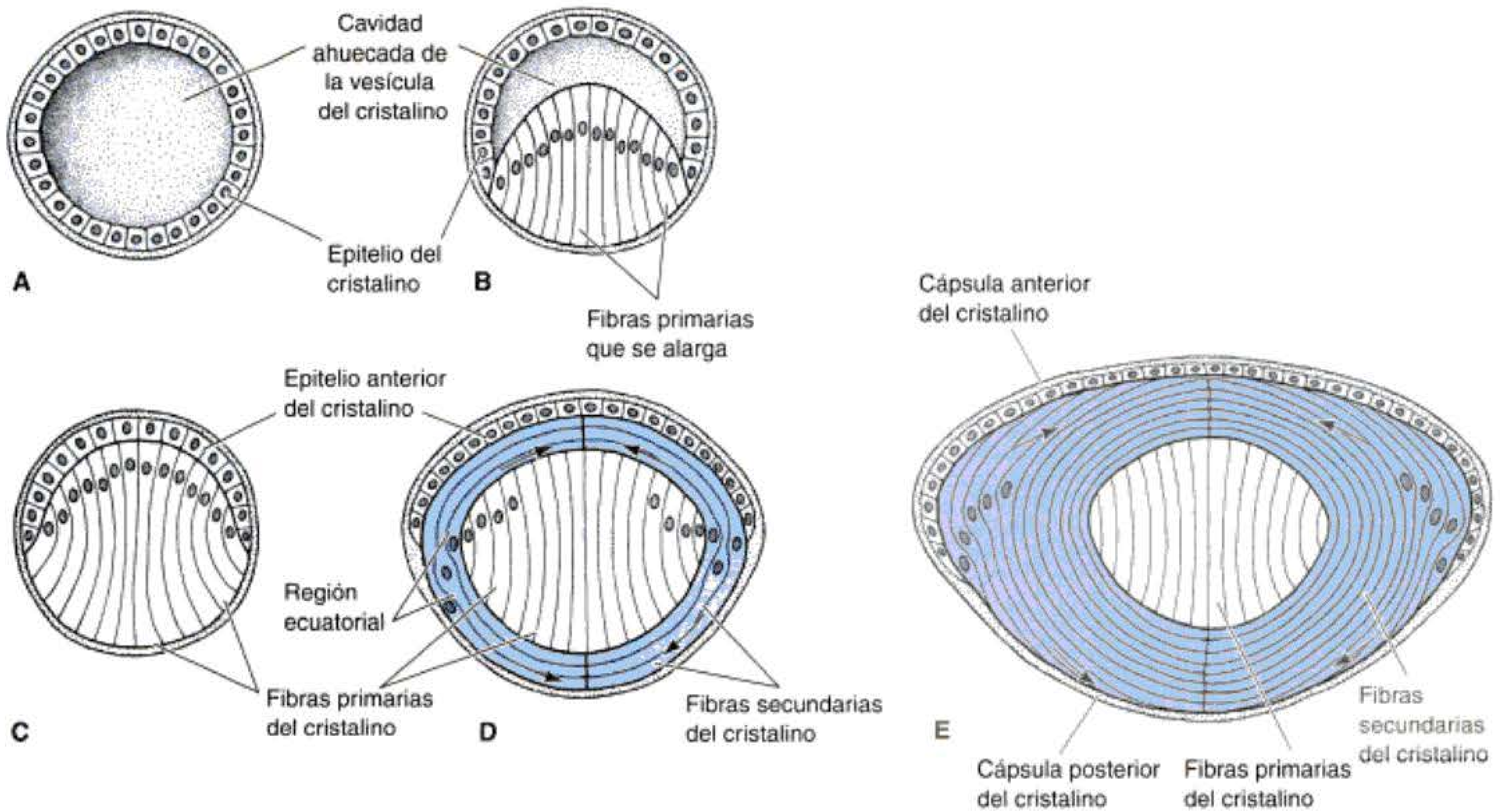


Fig. 12-30. Diferenciación de las células del cristalino. **A.** Vesícula del cristalino (como se muestra en la fig. 12-27D). **B.** Alargamiento de las células interiores, que producen las fibras primarias del cristalino. **C.** Cristalino lleno con fibras que sintetizan cristalina. **D.** Nuevas células del cristalino son derivadas del epitelio anterior del cristalino. **E.** A medida que crece el cristalino, se diferencian nuevas fibras y sus núcleos degeneran. (Según Paton y Craig 1974.)

una fibra del cristalino duran dos años (Papaconstantinou 1967).

Directamente por delante del cristalino se encuentra un tejido muscular pigmentado denominado iris. El músculo del iris controla el tamaño de la pupila (y le da al individuo su color de ojo característico). A diferencia de otros músculos del cuerpo (que son derivados del mesodermo), parte de este iris es derivado de la capa ectodérmica. Específicamente, esta región del iris se desarrolla desde una porción de la cúpula óptica que es continua con la retina neural, pero que no produce fotorreceptores.

SITIO WEB 12.11 **¿Por qué los bebés no ven bien? (Why babies don't see well?)** Los fotorreceptores de la retina no están completamente desarrollados al nacer. A medida que el niño crece volviéndose más viejo, la densidad de fotorreceptores se incrementa, permitiendo una mejor discriminación de lejos y casi unas 350 veces de la capacidad de absorber luz que está presente en el nacimiento.

La epidermis y el origen de las estructuras cutáneas

El origen de las células epidérmicas

Las células que cubren el embrión después de la neurulación forman la epidermis presuntiva. Originalmente, este tejido es una capa de una célula de espesor, pero en la mayoría de los vertebrados se convierte rápidamente en una estructura con dos capas de células. La capa externa da origen al **peridermo**, una cubierta temporal que se desprenderá una vez que se diferencia la capa interna para formar la verdadera epidermis. La capa interna, denominada la **capa basal** (o **estrato germinativo**), es un epitelio germinal que da origen a todas las células de la epidermis (fig. 12-31). La capa basal se divide para dar origen a otra población externa de células que constituyen la **capa espinosa**. Estas dos capas epidérmicas juntas son referidas como la **capa de Malpighi**. Las células de la capa de Malpighi se dividen para producir la **capa granulosa de la epidermis**, así llamada debido a que sus células están caracterizadas por gránulos de la proteína queratina. A diferencia de las células que se mantienen en la capa de Malpighi, las células de la capa granulosa no se dividen, pero comienzan a diferenciarse hacia células epidérmicas de la piel, los **queratinocitos**. Los gránulos de queratina se vuelven más prominentes a medida que los queratinocitos de la capa granulosa envejecen y migran hacia afuera para formar la **capa cornificada (estrato córneo)**. Estas células se convierten en sacos muertos y aplanados de proteína queratina y sus núcleos son empujados hacia un borde de la célula.

La profundidad de la capa cornificada varía de un sitio a otro, pero es en general de 10 a 30 células de espesor. Poco después del nacimiento, las células externas de la

* La mayor parte de esta piel se transforma en "polvillo de la casa". Si duda de esta afirmación, queme algo de polvillo; olerá como piel chamuscada.

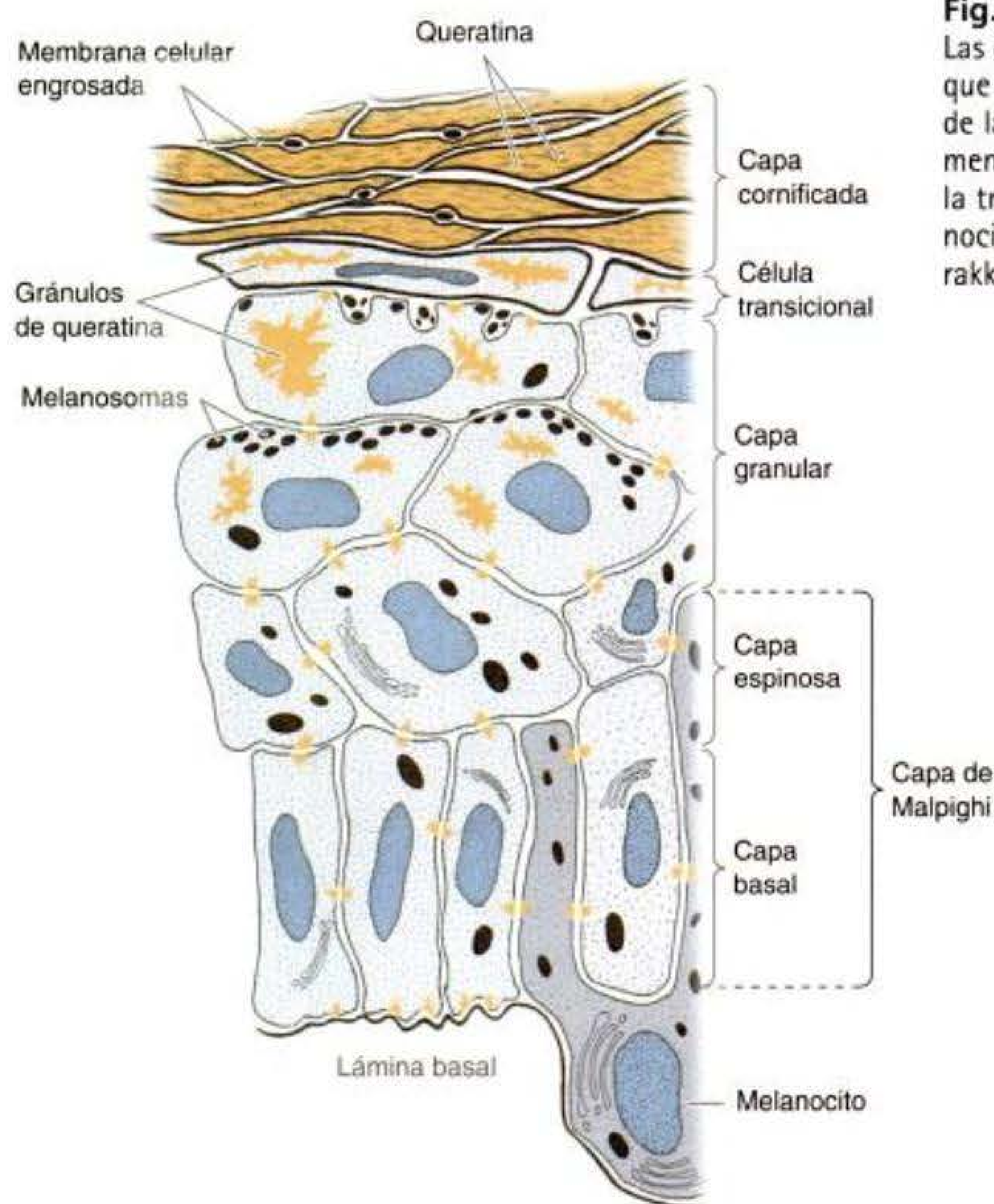


Fig. 12-31. Diagrama de las capas de la epidermis humana. Las células basales son mitóticamente activas, mientras que las células completamente queratinizadas características de la piel externa están muertas y son descamadas continuamente. Los queratinocitos obtienen sus pigmentos mediante la transferencia de melanosomas de los procesos de los melanocitos que residen en la capa basal. (Según Montagna y Parakkal 1974.)

capa cornificada se desprenden y son reemplazadas por nuevas células que provienen de la capa granulosa. Durante la vida, los queratinocitos muertos de la capa cornificada se van desprendiendo (las personas perdemos cerca de casi 1,5 gramos de estas células cada día*) y son reemplazadas por nuevas células, la fuente a partir de la cual se originan son las células mitóticas de la capa de Malpighi. Las células pigmentadas (melanocitos) de la cresta neural también residen en la capa de Malpighi, donde ellas transfieren sus sacos de pigmento (melanosomas) hacia los queratinocitos en desarrollo.

Las células madre epidérmicas de la capa de Malpighi están unidas a la lámina basal por sus proteínas integrina. Sin embargo, a medida que estas células llegan a estar comprometidas a diferenciarse, regulan en menos sus integrinas y finalmente las pierden a medida que ellas migran hacia la capa espinosa (Jones y Watt 1993).

Varios factores de crecimiento estimulan el desarrollo de la epidermis. Uno de éstos es el **factor de crecimiento transformante** α **(TGF-α)**. TGF-α es producido por las células basales y estimula su propia división. Cuando un factor de crecimiento es producido por la misma célula que lo recibe, este factor es denominado un **factor de crecimiento autocrino**. Tales factores deben ser cuidadosamente regulados debido a que si sus niveles son elevados, rápidamente son producidas más células. En la piel del humano adulto, una célula nacida en la capa de Malpighi tarda aproximadamente 8 semanas en alcanzar la capa cornificada y se mantiene allí por cerca de dos semanas. En individuos con psoriasis, una enfermedad caracterizada por la exfoliación de enormes cantidades de células epidérmicas, el tiempo de la célula en la capa cornificada es solamente de dos días (Weinstein y van Scott 1965; Halprin 1972). Esta condición ha sido relacionada a la sobreexpresión de TGF-α (que se produce secundariamente a una inflamación) (Elder y col. 1989). De modo semejante, si el gen TGF-α es unido a un promotor para queratina 14 (una de las principales proteínas de la piel expresada en las células basales) e insertado en el pronúcleo del ratón, los ratones transgénicos obtenidos activan al gen de TGF-α en sus células de la piel y no puede ser regulado en menos. El resultado es un ratón con piel escamosa, crecimiento atrofiado del pelo y un enorme excedente de epidermis queratinizada sobre su capa única de células basales (fig. 12-32B; Vassar y Fuchs 1991).

Otro factor de crecimiento necesario para el desarrollo epidérmico es el **factor de crecimiento de queratinocitos** (KGF; del inglés: *keratinocyte growth factor*; también conocido como factor de crecimiento fibroblástico 7), un factor parácrino que es producido por los fibroblastos de la dermis subyacente (derivado mesodérmico). KGF es recibido por las células basales de la epidermis y se piensa que regula su proliferación. Si el gen que codifica KGF es fusionado con el promotor de la queratina 14, KGF se vuelve autocrino en los ratones transgénicos obtenidos (fig. 12-32C). Estos ratones tienen una epidermis engrosada, piel holgada, demasiadas células basales alejadas y no tienen folículos pilosos, ni folículos de los pelos del bigote (Guo y col. 1993). En estos ratones, las células basales están "forzadas" hacia el camino de diferenciación epidérmico. El camino alternativo para las células basales conduce a la generación de los folículos pilosos.

Apéndices cutáneos

La epidermis y la dermis también interactúan en sitios específicos para crear las glándulas sudoríparas y los **apéndices cutáneos**: pelos, escamas, o plumas (según la especie). En mamíferos, la primera indicación de que el primordio de un folículo, o el **germen del pelo**, se formará en un lugar particular es una agregación de células en la capa basal de la epidermis. Esta agregación es dirigida por las células fibroblásticas dérmicas subyacentes y se produce a diferentes tiempos en distintos lugares del embrión. Es probable que las señales dérmicas causen la estabilización de la β-catenina en el ectodermo (Gat y col. 1998). Las células epidérmicas basales se alargan, se dividen y hunden en la dermis. Los fibroblastos dérmicos

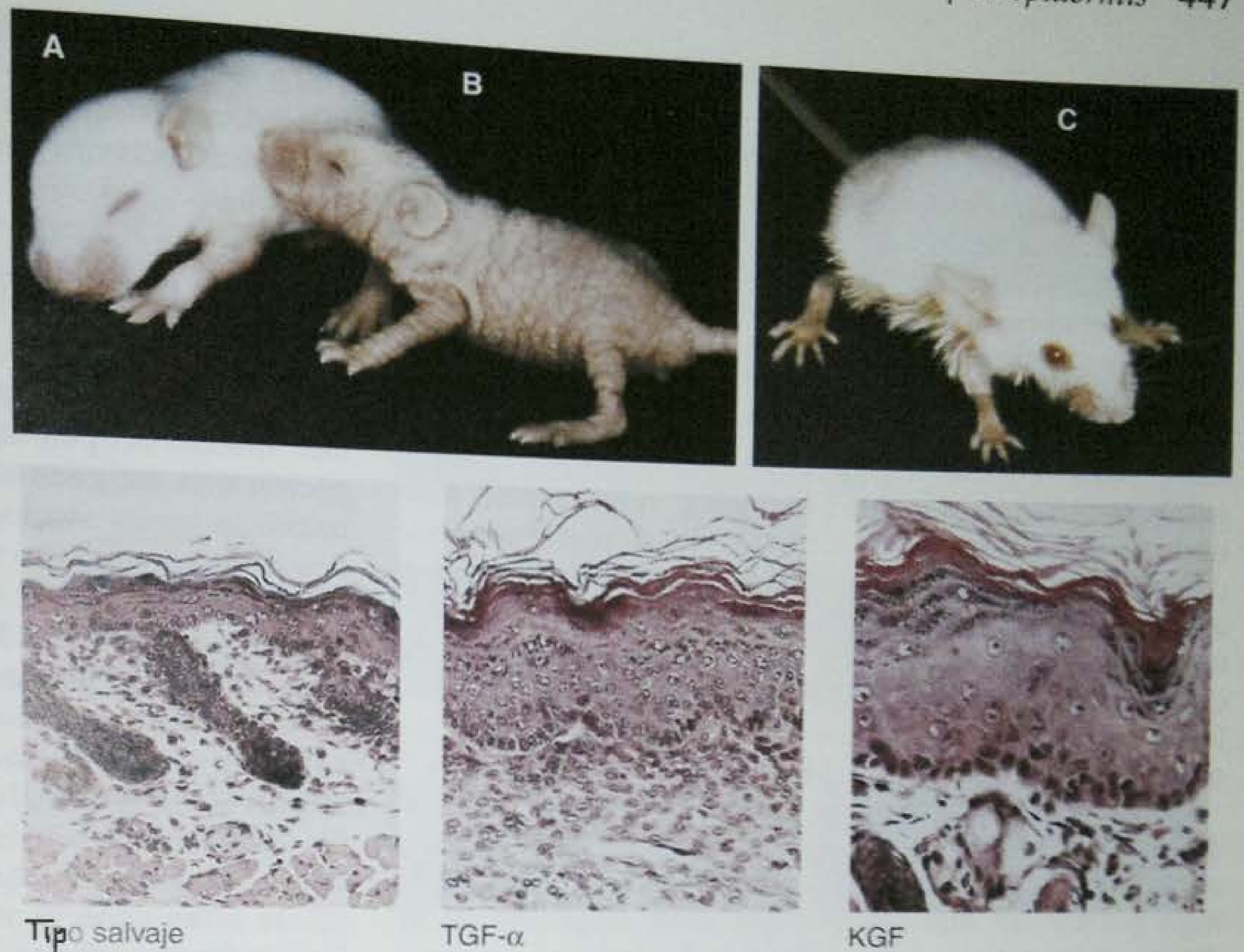


Fig. 12-32. Factores de crecimiento y proliferación epidérmica. **A.** Cría de ratón tipo salvaje. **B.** Compañera de camada de A, que está expresando altos niveles de TGF-α en sus queratinocitos. Ésta tiene piel escamosa y muy poco pelo. Debajo de cada ratón hay una sección transversal a través de su piel. El ratón que sobreexpresa TGF-α tiene amplias capas de epitelio queratinizado, que es descamado. **C.** Ratón transgénico que expresa bajos niveles de KGF en sus queratinocitos. Obsérvese la escasez de pelo alrededor de las patas, ojos y nariz. La sección de piel muestra una ausencia de folículos pilosos y un número incrementado de células epidérmicas basales. (A, B, de Vassar y Fuchs 1991; C, de Guo y col. 1993, microfotografías cortesía de E. Fuchs.)

responden a este ingreso de células epidérmicas mediante la formación de un pequeño nodulo (la **papila dérmica**) por debajo del germen del pelo. La papila dérmica luego empuja hacia arriba sobre las células madre basales y las estimula a dividirse más rápidamente. Las células basales responden produciendo células posmitóticas que se diferenciarán hacia el fuste o asta queratinizada del pelo (véase Hardy 1992; Miller y col. 1993). Los melanoblastos, que estaban presentes entre las células epidérmicas basales a medida que ingresaban, se diferencian en melanocitos y transfieren su pigmento hacia el fuste del pelo (fig. 12-33).

A medida que esto sucede, dos prominencias epiteliales comienzan a crecer sobre el lado del folículo piloso. Las células de la prominencia más inferior pueden conservar una población de células madre que regenerará el fuste del pelo periódicamente cuando es eliminado (Pinkus y Mehregan 1981; Cotsarelis y col. 1990). Estas células también incluyen a una población de células madre de melanocitos que continúan produciendo melanocitos durante la mayor parte de la vida de los mamíferos (Nishimura y col. 2002). Las células de la prominencia superior forman la **glándula sebácea,** que produce una secreción oleaginosa, el **sebo**. En muchos mamíferos, incluidos humanos, el sebo se mezcla con las células peridérmicas descamadas para formar el vérnix caseoso blanquecino, que cubre al feto en el nacimiento. Por lo tanto, así como hay una célula madre neural pluripotente cuyas recién nacidas llegan a ser células neuronales y gliales, parece haber una célula madre epidérmica pluri-

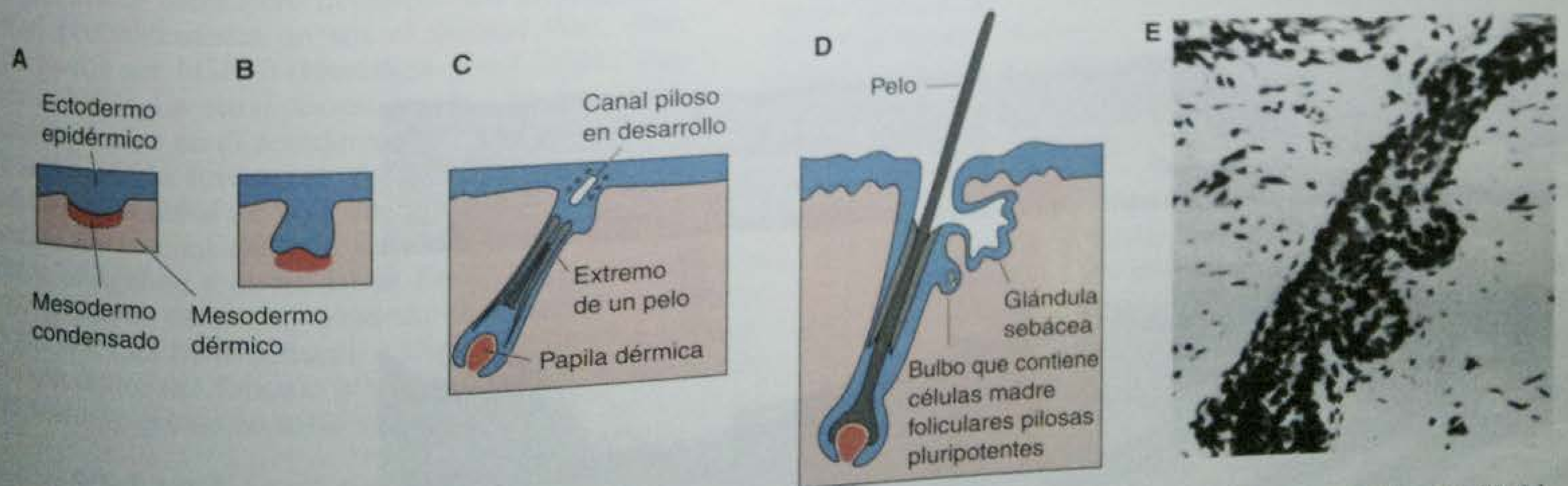


Fig. 12-33. Desarrollo de los folículos pilosos en la piel humana fetal. **A.** Las células epidérmicas basales se convierten en cilíndricas y protruyen levemente sobre la dermis. **B.** Las células epidérmicas continúan proliferando y las células del mesénquima dérmico se reúnen en la base del folículo piloso primario para formar una papila dérmica. **C.** La diferenciación del fuste del pelo comienza en el folículo piloso alargado. **D.** El fuste piloso queratinizado se extiende desde el folículo piloso, el esbozo secundario forma la glándula sebácea y por debajo de ésta hay una región que podría contener a las células madre pilosas para el siguiente ciclo de producción de pelo. **E.** Microfotografía de un folículo piloso alargado. (Según Hardy 1992 y Millar y col. 1993; microfotografía cortesía de W. Montagna.)

potente cuya progenie puede convertirse en epidermis, glándula sebácea o fuste del pelo.

Los primeros pelos en el embrión humano son de un tipo delgado, densamente distribuidos denominado **lanugo**. Este tipo de pelo se desprende generalmente antes del nacimiento y es reemplazado (al menos en parte, por nuevos folículos) por el **vello** corto y sedoso. El vello se mantiene sobre muchas partes del cuerpo humano frecuentemente consideradas sin pelo, tales como la frente y los párpados. En otras áreas del cuerpo, el vello da paso al "pelo terminal". Durante la vida de una persona, algunos de los folículos que produjeron vello pueden más tarde formar pelo y más tarde todavía volver a la producción de vello. Las axilas, por ejemplo, tienen folículos que producen vello hasta la adolescencia, en este momento comienzan a producir los fustes terminales. Por el contrario, en el patrón de calvicie masculino normal, los folículos del cuero cabelludo vuelven a producir un vello muy fino y sin pigmentar (Montagna y Parakkal 1974).

La formación de folículos pilosos (y plumas) requiere de una serie de interacciones inductivas recíprocas entre el mesénquima dérmico y el epitelio ectodérmico. El diálogo parece ser iniciado por una señal originada de la dermis que instruye a las células ectodérmicas a engrosarse y a agregarse para formar una placoda (Hardy 1992; Millar 2002). La placoda entonces le dice a las células dérmicas que se condensen y las células dérmicas condensadas instruyen a la epidermis a producir un fuste del pelo.

Genética del desarrollo de la formación del pelo

La búsqueda de los mecanismos moleculares de inicio y crecimiento del pelo es uno de los programas de investigación más antiguos en la biología del desarrollo. Se han hecho recientes avances a través de la fusión de la genética humana, ratones transgénicos y nuevas técnicas de inserción de gen.

El descubrimiento de cómo se originan ciertos fenotipos sin pelos en humanos llevó a los investigadores a importantes pasos en la vía molecular de la formación del pelo. Un síndrome denominado **displasia ectodérmica anhidrótica ligada al X** involucra anomalías del pelo, de las glándulas sudoríparas y del diente. En cada uno de los casos, las placodas ectodérmicas que producen normalmente estas estructuras no se forman, lo que sugiere que los productos del gen ligado al X están involucrados en

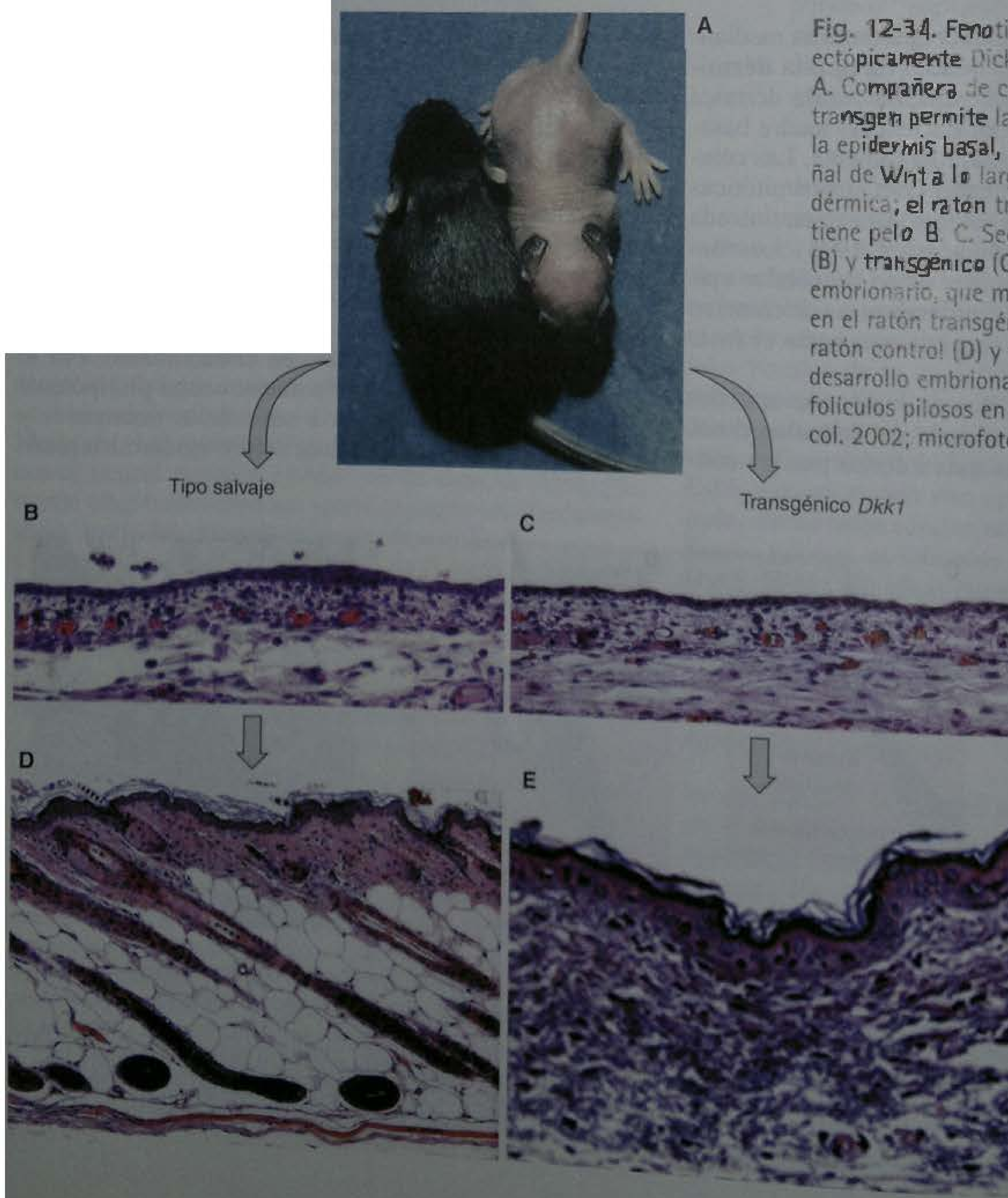


Fig. 12-34. Fenotipo de un ratón que secreta ectópicamente Dickkopf en la epidermis basal. A. Compañera de camada control transgénica. El transgen permite la expresión del gen *dickkopf* en la epidermis basal, que inhibe de este modo la señal de Wnt a lo largo de las capas epidérmica y dérmica; el ratón transgénico por esta razón no tiene pelo. B, C. Secciones de piel de ratón control (B) y transgénico (C) en el día 14,5 de desarrollo embrionario, que muestra la ausencia de placodas en el ratón transgénico. D, E. Secciones de piel de ratón control (D) y transgénico (E) en el día 18,5 de desarrollo embrionario, que muestra la ausencia de folículos pilosos en el ratón transgénico. (De Andl y col. 2002; microfotografías cortesía de S. Millar.)

el proceso de desarrollo que forma estas placodas. Las proteínas codificadas por este gen fueron identificadas por mRNA que hibridaron específicamente a la región del cromosoma X cuyas mutaciones causaron el síndrome. Estas proteínas, denominadas **ectodisplasinas**, son sintetizadas en el ectodermo embrionario (Bayés y col. 1998; Mikkola y col. 1999; Montonen y col. 1998). La principal proteína ectodisplasina es eliminada de la superficie celular por segmentación proteolítica y ésta se une a su receptor sobre las células adyacentes que están también en el ectodermo (Koppinen y col. 2001).

Pero ¿qué activa la expresión de ectodisplasina en el ectodermo? Un papel para la señal de Wnt fue sugerido firmemente por el trabajo de Andl y sus colegas (2002). Para determinar si la señal de Wnt es crítica para el inicio del desarrollo folicular, ellos insertaron en los embriones de ratón un transgén fusionado que consistía en gen *dickkopf* unido al promotor del gen *keratin14*. Keratin14 es expresado frecuentemente en la capa basal de la epidermis, como se vio antes. Dickkopf es un inhibidor potente y soluble de la señal de Wnt (véase cap. 10) y puede difundir desde las células basales hacia el ectodermo que está por arriba y la dermis que se encuentra por debajo.

Los ratones embrionarios que expresan la proteína Dickkopf en su piel tenían una ausencia completa de sus folículos pilosos, bigotes, dientes y glándulas mamarias (fig. 12-34). En efecto, la señal de Wnt parece ser producida muy temprano, debido a que su ausencia evita la producción de placodas e inhibe la expresión de todos los otros genes involucrados en el diálogo que produce el folículo piloso (fig. 12-35).

Mediante hibridación in situ para varias proteínas en los ratones mutantes, se ha trazado una vía hipotética para el desarrollo temprano del fuste del pelo (fig. 12-35F). Las acciones de la señal de la familia Wnt son requeridas en la dermis para generar el primer mensajero dérmico. Sin embargo, la señal probablemente no sea el mismo Wnt, sino que puede ser FGF10 (Huelsken y col. 2001; Tao y col. 2002). La señal dérmica activa la síntesis de ectodisplasina en el ectodermo. Esta proteína ayuda a iniciar la formación de placodas y también activa a otra señal de Wnt que viene desde las placodas. Esta señal de Wnt regula la expresión de Sonic hedgehog y de los BMP. Sonic hedgehog activa la condensación dérmica y continúa el desarrollo del folículo piloso. Las BMP inducen a Dickkopf en el mesénquima alrededor del folículo piloso y reprimen el desarrollo del folículo piloso en estas células vecinas.

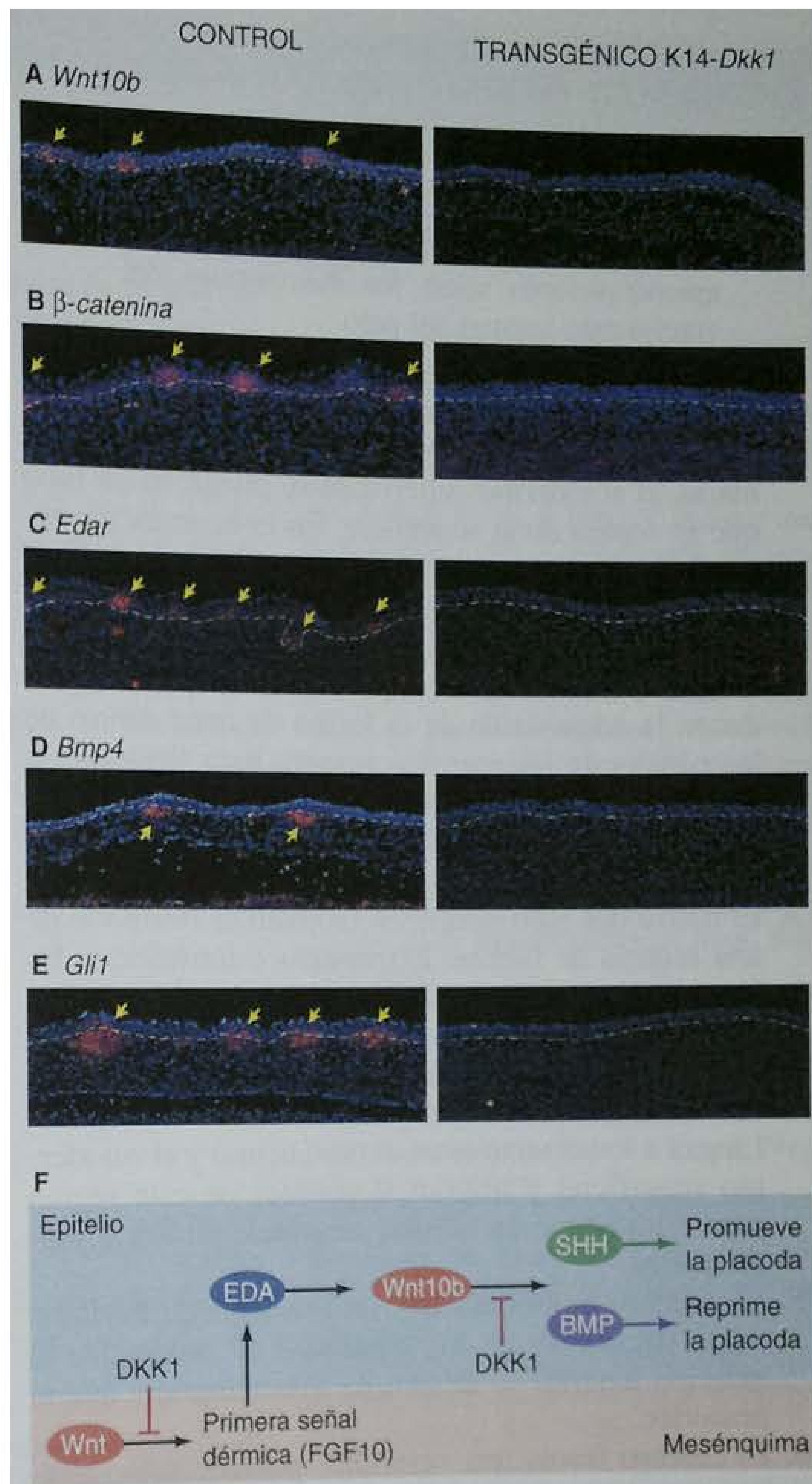


Fig. 12-35. Expresión génica en ratones control y transgénico que expresan Dickkopf. La hibridación in situ para varias proteínas fue llevada a cabo alrededor del día embrionario 15 y se observa en ro jo (flechas). **A.** Wnt10b. **B.** β-catenina. **C.** Receptor de ectodisplasina. **D.** BMP4. **E.** Gli1 inducible por Sonic hedgehog (que indica la presencia de Sonic hedgehog). **F.** Bosquejo de la vía que regula el desarrollo del folículo piloso en los ratones. (Según Andl y col. 2002; microfotografías cortesía de S. Millar.)

SITIO WEB 12.12 **Variación normal en la producción de pelo (Normal variation in human hair production).** El pelo humano tiene un ciclo de vida complejo. Además, algunos pelos (como los de nuestras pestañas) crecen cortos mientras que otros (como los del cuero cabelludo) crecen largos. El patrón del tamaño y del grosor del pelo (o su falta) es determinado por factores paracrinos y endocrinos.

SITIO WEB 12.13 **Mutaciones de la producción de pelo humano (Mutations of human hair production).** Además de la variación normal, hay también mutaciones heredadas que interfieren en el desarrollo normal del pelo. Algunas personas nacen sin la capacidad para que el pelo crezca, mientras que

Resumen: el sistema nervioso central y la epidermis

otras desarrollan pelo sobre la totalidad de su cuerpo. Estas condiciones genéticas nos dan aproximaciones sobre los mecanismos del crecimiento normal del pelo.

1. El tubo neural se forma a partir del modelado y plegamiento de la placa neural. En la neurulación primaria, el ectodermo superficial se pliega en un tubo que se separa de la superficie. En la neurulación secundaria, el ectodermo forma un cordón y luego forma una cavidad dentro de éste.
2. La neurulación primaria es regulada por fuerzas intrínsecas y extrínsecas. Las fuerzas intrínsecas producen la adquisición de la forma de cuña dentro de las células de las regiones bisagra para flexionar la placa neural. Las fuerzas extrínsecas incluyen la migración del ectodermo superficial hacia el centro del embrión.
3. El cierre del tubo neural es también el resultado de una mezcla de fuerzas extrínsecas e intrínsecas. En los seres humanos pueden producirse varias enfermedades si el tubo neural falla en su cierre.
4. Las células de la cresta neural se originan en los bordes entre el tubo neural y el ectodermo superficial. Llegan a localizarse entre el tubo neural y el ectodermo superficial y migran alejándose de esta región para convertirse en células neurales, gliales y pigmentarias.
5. En muchos embriones hay un gradiente de madurez (específicamente en los amniotas) de modo que el extremo anterior se desarrolla más temprano que el posterior.
6. El cerebro forma tres vesículas: prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y rombencéfalo (cerebro posterior). El prosencéfalo y el rombencéfalo se subdividirán.
7. El cerebro se expande mediante la secreción de fluido que genera presión positiva sobre las vesículas.
8. El establecimiento del patrón dorsoventral del tubo neural es llevado a cabo por las proteínas de la superfamilia de TGF-β secretadas desde el ectodermo superficial y desde la placa del techo del tubo neural y por la proteína Sonic hedgehog secretada desde las células de la notocorda y de las de la placa del piso. Los gradientes de estas proteínas disparan la síntesis de factores de transcripción particulares que especifican al neuroepitelio.
9. Las neuronas del cerebro están organizadas en estructuras corticales (capas) y núcleos (grupos).
10. Nuevas neuronas son formadas por la división de células madre neurales en la pared del tubo neural (denominada zona ventricular). Los precursores neurales resultantes, o neuroblastos, pueden migrar alejándose de la zona ventricular y formar una nueva capa, denominada la zona del manto (sustancia gris). Las neuronas que se forman más tarde migrarán a través de las capas existentes. Este proceso forma las capas corticales.
11. En el cerebelo, las neuronas en migración forman una segunda zona germinal, denominada capa granulosa externa. Las neuronas externas migran hacia la zona ventricular sobre los procesos de las células gliales.
12. La corteza cerebral humana, denominada neocorteza, tiene seis capas. Los destinos celulares son con frecuencia fijados a medida que experimentan su última división. Las neuronas derivadas de la misma célula madre podrían terminar en diferentes regiones funcionales del cerebro.
13. Los cerebros humanos parecen diferir de los de otros primates por su conservación de la velocidad de crecimiento neuronal fetal durante la niñez temprana, la migración de las células desde el telencéfalo al diencéfalo, la cantidad de actividad transcripcional, la presencia de ciertos alelos de *FoxP2* y por un crecimiento neuronal y mielinización acelerados que se producen durante la pubertad.
14. Las células madre neurales han sido observadas en el cerebro humano adulto. Ahora se cree que los seres humanos pueden continuar produciendo neuronas durante la vida aunque en ningún caso cerca de la tasa fetal.
15. Las dendritas reciben señales desde otras neuronas, mientras que los axones transmiten las señales a otras neuronas. El espacio entre las células donde las señales son transferidas desde una neurona a otra (mediante la liberación de neurotransmisores) se denomina sinapsis.
16. Los axones crecen desde el cuerpo de la neurona o soma y son guiados por el cono de crecimiento.
17. La retina se forma desde una vesícula óptica que se extiende del cerebro. Pax6 juega un papel principal en la formación del ojo y la regulación en menos de Pax6 por Sonic hedgehog en el centro del cerebro separa la región formadora del ojo del cerebro por la mitad. Si Sonic hedgehog no es expresado aquí, se produce un único ojo medial.
18. Las células fotorreceptoras de la retina recogen la luz y transmiten un impulso eléctrico a través de las interneuronas hacia las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares de la retina forman el nervio óptico.
19. El cristalino y la córnea se forman desde el ectodermo superficial. Ambos deben ser transparentes
20. La capa basal de ectodermo superficial se convierte en la capa germinativa de la piel. Estas células basales se dividen para producir las células epidérmicas (queratinocitos).
21. Los factores paracrinos como TGF-α y KGF (FGF7) son importantes en el desarrollo normal de la piel.

Bibliografía citada

22. Los apéndices cutáneos –pelos, plumas y escamas– son formados mediante interacciones epitelio-mesenquimáticas entre la epidermis y el mesodermo dérmico. La vía de la señal de Wnt parece desempeñar un papel crítico en este proceso.

Adams, N. C., T. Tomoda, M. Cooper, G. Dietz and M. E. Hatten. 2002. Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. Development 129: 965-972.

Alder, J., K. J. Lee, T. M. essell and M. E. Hatten. 1999. Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. Nature Neurosci. 2: 535-540.

Alvarez, I. S. and G. C. Schoenwolf. 1992. Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. J. Exp. Zool. 261: 340-348.

Andl, T., S. T. Reddy, T. Gaddapara and S. E. Millar. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. Dev. Cell 2: 643-653.

Baird, A. A. and 7 others. 1999. Functional magnetic resonance imaging of facial affect recognition in children and adolescents. J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatr. 38: 195-199.

Balinsky, B. I. 1975. Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Barinaga, M. 2003. Newborn neurons search for meaning. Science 299: 32-34.

Bayés, M., A. J. Hartung, S. Ezer, J. Pispa, J. Thesleff, A. K. Srivastava and J. Kere. 1998. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. Hum. Mol. Genet. 7: 1661-1669.

Bogin, B. 1997. Evolutionary hypotheses for human childhood. Yrbk Phys. Anthropol. 40: 63-89.

Botto, L. D., C. A. Moore, M. J. Khoury and J. D. Erickson. 1999. Neural-tube defects. New Engl. J. Med. 341: 1509-1519.

Briscoe, J., L. Sussel, D. Hartigan-O,Connor, T. M. lessell, J. L. R. Rubenstein and J. Ericson. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling. Nature 398: 622-627.

Burnside, B. 1973. Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation. Am. Zool. 13: 989 1006.

Cassidy, R. and J. Frisén. 2001. Stem cells on the brain. Nature 412: 690-691.

Catala, M., M.-A. Teillet and N. M. Le Douarin. 1995. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. Mech; Dev. 51: 51-65.

Catala, M., hl.-A. Teillet, E. M. De Robertis and N. M. Le Douarin. 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: While regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. Development 122: 2599-2610.

Centers for Disease Control. 1992. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 41: 1-7.

Chenn, A. and S. K. McConnell. 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notchl immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell 82: 631-641.

Chiang, C., Y. Litingung, E. Lee, K. K. Young, J. E. Corden, H. Westphal and P. A. Beachy. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. Nature 383: 407-413.

Chou, H. H. and 9 others. 1998. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11751-11756.

Colas, J.-F. and G. C. Schoenwolf. 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. Dev. Dynam. 221: 117-145.

Cotsarelis, G., T.-T. Sun and R. M. Lavker. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. Cell 61: 1329-1337.

Coulombre, A. J. 1956. The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. I. Control of eye size. J. Exp. Zool. 133: 211-225.

Coulombre, A. J. 1965. The eye. In R. DeHaan and H. Ursprung (eds.), Organogenesis. Holt, Rinehart & Winston, New York, pp. 217-251.

Czeizel, A. and I. Dudas. 1992. Prevention of first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N. Engl. J. Med. 327: 1832-1835.

Davenport, R. W., P. Dou, V. Rehder and S. B. Kater. 1993. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. Nature 361: 721-724.

De Marco, P. and 8 others. 2000. Folate pathway gene alterations in patients with neural tube defects. Am. J. Med. Genet. 95: 216-223.

Desmond, M. E. 1982. A description of the occlusion of the lumen of the spinal cord in early human embryos. Anat. Rec. 204: 89-93.

Desmond, M. E. and M. C. Field. 1992. Evaluation of neural fold fusion and coincident initiation of spinal cord occlusion in the chick embryo. J. Comp. Neurol. 319: 246-260.

Desmond, M. E. and G. C. Schoenwolf. 1986. Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 97: 25-46.

Detrick, R. I., D. Dickey and C. R. Kintner. 1990. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in Xenopus embryos. Neuron 4: 493-506.

Doetsch, F., I. Caillé, D. A. Lim, J. M. García-Verdugo and A. Alvarez-Buylla. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97: 703-716.

Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St.-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon and A. McMahon. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell 75: 1417-1430.

Edmondson, J. C., R. K. H. Liem, J. C. Kuster and M. E. Hatten. 1988. Astrotactin: A novel neuronal cell surface antigen that mediates neuronal-astroglial interactions in cerebellar microcultures. J. Cel. Biol. 106: 505-517.

Eichele, G. 1992. Budding thoughts. Sciences (Jan.), 30-36.

of differences in integrin function and expression. Cell 73: 713-724.

Jordan, T. and 7 others. 1992. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. Nature Genet. 1: 328-332.

Karfunkel, P. 1972. The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. J. Exp. Zool. 181: 289-302.

Kato, T., K. Yokouchi, N. Fukushima, K. Kawagishi, Z. Li and T. Moriizumi. 2001. Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. Neurosci. Lett. 307: 17-20.

Keller, R., J. Shih, A. K. Sater and C. Moreno. 1992. Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of Xenopus. Dev. Dynam. 193: 218-234.

Kelley, R. I. and 7 others. 1996. Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: Does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic hedgehog? Am. J. Med. Genet. 66: 478-484.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage. 1997a. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proc Natl. Acad. Sci. USA 94: 10409-10414.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage. 1997b. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386: 493-495.

King, M. C. and A. C. Wilson. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. Science 188: 107-116.

Komuro, H. and P. Rakic. 1992. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. Science 157: 806-809.

Koppinen, P., J. Pispa, J. Laurikkala, I. Thesleff and M. L. Miklcola. 2001. Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. Exp. Cell. Res. 269: 180-192.

Kornack, D. R. and P. Rakic. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5768-5773.

Lai, C. S., S. E. Fisher, J. A. Hurst, F. Vargha-Khadem and A. P. Monaco. 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. Nature 413: 519-523.

Lamoureux, P., R. E. Buxbaum and S. R. Heidemann. 1989. Direct evidence that growth cones pull. Nature 340: 159-162.

Larsen, W. J. 1993. Human Embryology. Churchill Livingstone, New York.

Lawson, A., H. Anderson and G. C. Schoenwolf. 2001. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. Anat. Rec. 262: 153-168.

Lee, S.-K. and S. L. Pfaff. 2001. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. Nature Neurosci. Suppl. 4: 1183-1191.

Letinic, K. and P. Rakic. 2001. Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. Nature Neurosci. 4: 931 - 936.

Letourneau, P. C. 1977. Regulation of neuronal morphogenesis by cell-substratum adhesion. Soc. Neurosci. Symp. 2: 67-81.

Letourneau, P. C. 1979. Cell substratum adhesion of neurite growth cones and its role in neurite elongation. Exp. Cell. Res. 124: 127-138.

Liem, K. F., Jr., G. Tremmi, H. Roelink and T. M. Jessell. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. Cell 82: 969-979.

Liem, K. F., Jr., G. Tremmi and T. M. Jessell. 1997. A role for the roof plate and its resident TGF–related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. Cell 91: 127-138.

Liem, K. F., Jr, T: M. Jessell and J. Briscoe. 2000. Regulation of the neural patterning activity of Sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. Development 127: 4855-4866.

Little, J. and J. M. Elwood. 1992a. Ethnic origin and migration. In J. M. Elwood, J. Little and J. H. Elwood (eds.), Epidemiology and Control of Neural Tube Defects. Oxford University Press, Oxford, pp. 146-167.

Little, J. and J. M. Elwood. 1992b. Seasonal vaiation. In J. M. Elwood, J. Little and J. H. Elwood (eds.), Epidemiology and Control of Neural Tube Defects. Oxford University Press, Oxford, pp. 195-246.

Lumsden, A. and R. Keynes. 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. Nature 337: 424-428.

Magavi, S. S., B. R. Leavitt and J. D. Macklis. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature 405: 951 -955.

Mann, I. 1964. The Development of the Human Eye. Grune and Stratton, New York.
Manzanares, M. and R. Krumlauf. 2000. Raising the roof. Nature 403:720-721.

Martin, R. D. 1990. Primate Origins and Evolution: A Phylogenetic Reconstruction. Princeton University Press, Princeton.

Matsunami, H. and M. Takeichi. 1995. Fetal brain subdivisions defined by T- and E- cadherins expressions: Evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. Dev. Biol. 172: 466-478.

McConnell, S. K. and C. E. Kaznowski. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing cerebral cortex. Science 254: 282-285.

Mikkola, M. L., J. Pispa, M. Pekkanen, L. Paulin P. Nieminen, J. Kere and I. Thesleff. 1999. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. Mech. Dev. 88: 133-146.

Millar, S. E. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. J. Invest. Dermatol. 118:216-225.

Miller, S. J., R. M. Lavker and T.-T. Sun. 1993. Keratinocyte stem cells of corneal, skin, and hair follicle. Semin. Dev. Biol. 4: 217-240.

Milunsky, A., H. Jick, S. S. Jick, C. L. Bruell, D. S. Maclaughlen, K. J. Rothman and W. Willett. 1989. Multivitamin folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. J. Am. Med. Assoc. 262: 2847-2852.

Montagna, W. and P. F. Parakkal. 1974. The piliary apparatus. In W. Montagna (ed.), The Structure and Formation of Skin. Academic Press, New York, pp. 172-258.

Montagu, M. F. A. 1962. Time, morphology, and neoteny in the evolution of man. In M. F. A. Montagu (ed.) Culture and Evolution of Man. Oxford University Press, New York.

Montonen, O. and 10 others.1998. The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and

yos. Development 2 [Suppl.]: 157-168.

Schoenwolf, G. C. 1991b. Cell movements in the epiblast during gastrulation and neurulation in avian embryos. In R. Keller et al. (eds). Gastrulation. Plenum, New York, pp. 1-28.

Schoenwolf, G. C. and I. S. Alvarez. 1989. Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate. Development 106: 427-439.

Schoenwolf, G. C. and M. E. Desmond. 1984. Descriptive studies of the occlusion and reopening of the spinal canal of the early chick embryo. Anat. Rec. 209: 251-263.

Shu, W., H. Yang, L. Zhang, M. M. Lu and E. E. Morrisey. 2001. Characterization of a new subfamily of vinged-helix-/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. J. Biol. Chem. 276: 27488-27497.

Shingo, T. and 7 others. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. Science 299: 117-120.

Sidman, R. L., M. M. Dickie and S. H. Appel. 1964. Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. Science 144: 309-312.

Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf. 1989. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. J. Exp. Zool. 250: 49-62.

Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf. 1991. Further evidence of extrinsic forces in bending of the neural plate. J. Comp. Neurol. 307: 225-236.

Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf. 1997. Neurulation: Coming to closure. Trends Neurosci. 11: 510-517.

Sowell, E. R., P. M. Thompson, C. J. Holmes, T. L. Jernigan and A. W. Toga. 1999. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. Nature Neurosci 2: 859-861.

Streit, A. and C. D. Stern. 1999. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: Involvement of FGF and BMP activity. Mech. Dev. 82:51-66.

Streit, A., A. J.. Berliner, C. Papanayoutou, A. Sirulnik and C. D. Stern. 2000. Initiation of neural induction by FGF signaling before gastrulation. Nature 406: 74-78.

Tao, H., Y. Yoshimoto, H. Yoshioka, T. Nohno, S. Noji and H. Ohuchi. 2002. FGF10 is a mesenchymally derived stimulator for epidermal development in the chick embryonic skin. Mech. Dev. 116: 39-49.

Turner, D. L. and C. L. Cepko. 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature 328: 131-136.

Van Allen, M. I. and 15 others. 1993. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. Am. J. Med. Genet. 47: 723-743.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nature Neurosci. 2: 266-270.

van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer and F. H. Gage. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature 415: 1030-1034.

van Straaten, H. W. M., J. W. M. Hekking, E. J. L. M. Wiertz-Hoessels, F. Thors and J. Drukker. 1988. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. Anat. Embryol. 177: 317-324.

Vargha-Khadem, F., K. Watkins, K. Alcock, P. Fletcher and R. Passingham. 1995. Praxic and nonverbal cognitive deficits in a large family with a genetically transmitted speech and language disorder. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 930-933.

Vassar, R. and E. Fuchs. 1991. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-α during epidermal development and differentiation. Genes Dev. 5: 714-727.

Vrba, E. 1996. Climate, heterochrony, and human evolution. J. Anthropol. Res. 52: 1-28.

Wallace, V. A. 1999. Purkinje cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. Curr. Biol. 9: 445-448.

Walsh, C. and C. L. Cepko. 1992. Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. Science 255: 434-440.

Walsh, C. and C. L. Cepko. 1998. Clonally related cortical cells show several migration patterns. Science 241: 1342-1345.

Wasserman, C. R., G. M. Shaw, S. Selvin, J. B. Gould and S. L. Syme. 1998. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. Am. J. Pub. Health 88: 1674-1680.

Weinstein, G. D. and E. J. van Scott. 1965. Turnover times of normal and psoriatic epidermis. J. Invest. Dermatol. 45: 257-262.

Whitehead, A. S. and 8 others. 1995. A genetic defect in 5,10-methylenetetrafolate reductase in neural tube defects. Q. J. Med. 88: 763-766.

Wickelgren, I. 1999. Nurture helps mold able minds. Science 283: 1832-1834.

Wilson, A. C. 1998. Quoted in A. Gibbons Which of our genes makes us human? Science 281: 1432-1434.

Wilson, S. I. and T. Edlund. 2001. Neural induction: Toward a unifying mechanism. Nature Neurosci. 4: 1161-1168.

Wilson, S. I., A. Rydstrom, T. Trimborn, K. Willert, R. Nusse, T. M. Jessell and T. Edlund. 2001. The status of Wnt signaling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. Nature 411; 325-330.

Yamada, K. M., B. S. Spooner and N. K. Wessells. 1971. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J. Cell. Biol. 49: 614-635.

Yamada, T., M. Placzek, H. Tanaka, J. Dodd and T. M. Jessell. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: Polarizing activity of door plate and notochord. Cell 64: 635-647.

Yamada, T., S. L. Pfaff, T. Edlund and T. M. Jessell. 1993. Control of cell pattern in the neural tube: Motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell 73: 673-686.

Zolessi, F. R. and C. Arruti. 2001. Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. BMC Dev: Biol. 1: 7.

Capítulo 13 Células de la cresta neural y especificidad axonal

Aún, más allá de todas las preguntas de la cantidad allí se encuentran preguntas del patrón que son esenciales para la comprensión de la naturaleza.

ALFRED NORTH WHITEHEAD (1934)

Como el entomólogo en la búsqueda de mariposas vivamente coloreadas, mi atención de cazador, en el jardín de la sustancia gris, es sobre células con delicadas y elegantes formas, las mariposas misteriosas del alma.

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL (1937)

EN ESTE CAPÍTULO CONTINUARÁ la discusión del desarrollo ectodérmico, centrado aquí sobre las células de la cresta neural y la guía axonal. Las células de la cresta neural y los conos de crecimiento axonal (los extremos móviles del axón) comparten la propiedad de tener que migrar lejos de su fuente de origen hacia lugares específicos en el embrión. Ellos tienen que reconocer las señales para comenzar su migración y tienen que responder a señales que las guían a lo largo de rutas específicas hasta sus destinos finales. Investigaciones recientes han descubierto que muchas de las señales reconocidas por las células de la cresta neural y por los conos de crecimiento axonal son las mismas.

LA CRESTA NEURAL

Aunque deriva del ectodermo, la cresta neural ha sido denominada a veces la cuarta capa germinativa debido a su importancia. Hasta se ha dicho, algo hiperbólicamente, que "la única cosa interesante sobre vertebrados es la cresta neural" (citado por Thorogood 1989). Las células de la cresta neural migran extensamente para generar un número prodigioso de tipos celulares diferenciados. Estos tipos celulares incluyen: 1) a las células neuronales y gliales de los sistemas nerviosos sensorial, simpático y parasimpático; 2) las células productoras de adrenalina (médula) de la glándula suprarrenal; 3) las células de la epidermis que contienen pigmento, y 4) muchos de los componentes de los tejidos conectivos y esqueléticos de la cabeza. El destino de las células de la cresta neural depende, a gran escala, hacia donde ellas migran y se colocan. El cuadro 13-1 es un resumen de algunos de los tipos celulares derivados de la cresta neural.

Especificación y regionalización de la cresta neural

Las células de la cresta neural se originan en la región más dorsal del tubo neural. Los experimentos de trasplantes por medio de los cuales una placa neural de codorniz es injertada en un ectodermo no neural de pollo han demostrado que la yuxtaposición de estos tejidos induce la formación de células de la cresta neural y que la placa neural prospectiva y la epidermis prospectiva contribuyen a la cresta neural (Selleck y Bronner-Fraser 1995; véase además Mancilla y Mayor 1996).

El límite entre la placa neural y el ectodermo epidérmico está caracterizado por altos niveles de BMP. Las células de la cresta neural se forman donde estos altos niveles de BMP se encuentran con altos niveles de Wnt6 en la epidermis presuntiva. Estos dos factores –BMP y Wnt6– parecen causar la expresión de factores de transcripción particulares, incluidos **Slug** y **FoxD3**, en aquellas células que deben convertirse en la cresta neural (fig. 13-1; Kos y col. 2001; Sasai y col. 2001; Garcia-Castro y col. 2002). FoxD3 parece ser crítico para la especificación de las células ectodérmicas como células de la

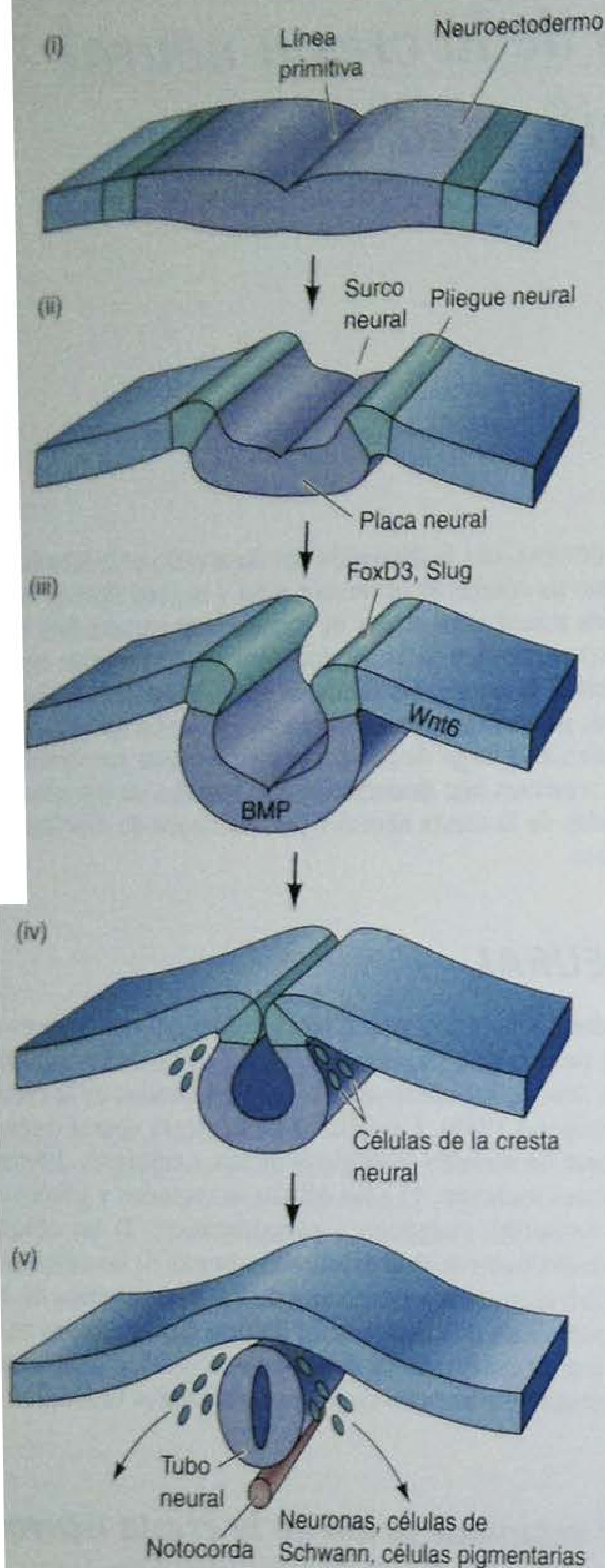


Fig. 13-1. Representación esquemática de la formación de la cresta neural en un embrión de amniota (pollo), mostrada en una sección transversal. Las células de la cresta neural se forman en la unión entre el ectodermo epidérmico que expresa Wnt6 y el ectodermo neural presuntivo que produce BMP. (Según Trainor y Krumlauf 2002.)

cresta neural. Cuando es inhibido el funcionamiento de FoxD3, la diferenciación de la cresta neural es inhibida. Por el contrario, cuando FoxD3 es expresado ectópicamente (mediante la electroporación de FoxD3 en las células de la placa neural), las células de la placa neural comienzan a expresar proteínas características de la cresta neural. La proteína Slug parece ser necesaria para que las células de la cresta neural dejen el epitelio y migren.

Cuadro 13-1 *Algunos derivados de la cresta neural)*

Derivado	*Tipo celular o estructura derivada*
Sistema nervioso periférico (SNP)	Neuronas, incluidos los ganglios sensoriales, los ganglios simpáticos y parasimpáticos, y plexos Células de la neuroglia Células de Schwann
Derivados endocrinos y paraendocrinos	Médula suprarrenal Células secretoras de calcitonina Células tipo I del cuerpo carotídeo
Células pigmentarias	Células pigmentarias epidérmicas
Cartílago y hueso facial	Cartílago y huesos faciales y del cráneo ventral anterior
Tejido conectivo	Endotelio y estroma corneanos Papila dentaria Dermis, músculo liso y tejido adiposo de la piel de la cabeza y del cuello Tejido conectivo de las glándulas salivales, lacrimales, timo tiroides e hipófisis Tejido conectivo y músculo liso en el origen de las arteria del arco aórtico

Fuente: Según Jacobson 1991, basado en multiples fuentes.

SITIO WEB 13.1 **Neurulacion en las aves (Avian neurulation).** Junto con la figura 13-1, este sitio web muestra una animación pensada de la formación de la cresta neural del pollo.

La cresta neural puede dividirse en cuatro dominios principales (pero superpuestos), cada uno con derivados y funciones característicos (fig. 13-2):

- Las células de la **cresta neural craneal (cefálica)** migran en sentido dorsolateral para producir el mesénquima craneofacial que se diferencia hacia cartílago, hueso, neuronas craneales, glía y tejidos conectivos de la cara. Las células ingresan a los arcos y a las bolsas faríngeas para dar origen a las células del timo, los odontoblastos de los primordios del diente y los huesos del oído medio y de la mandíbula.*

* Los **arcos faríngeos (branquiales)** (véase fig. 1-3) son estructuras que sobresalen sobre la superficie externa en la región de la cabeza y del cuello, y es hacia donde migran las células de la cresta neural. Las **bolsas faríngeas** se forman entre estos arcos (sobre el lado endodérmico) y dan origen a las glándulas tiroides, paratiroides y al timo.

- Las células de la **cresta neural del tronco** toman una de las dos rutas principales. La ruta migratoria temprana la toman las células de la cresta neural del tronco ventrolateralmente a través de la mitad anterior de cada esclerotoma. (Los **esclerotomas** son bloques de células mesodérmicas, derivados de los somitas, que se diferenciarán hacia el cartílago de la columna vertebral –espina dorsal.) Aquellas células de la cresta neural del tronco que se mantienen en los esclerotomas forman los **ganglios de la raíz dorsal** que contienen las neuronas sensoriales. Aquellas células que continúan más ventralmente forman los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal y los grupos de neuronas que rodean la aorta. Más tarde, las células de la cresta neural del tronco que se convierten en los **melanocitos** que sintetizan pigmentos migran en sentido dorsolateral hacia el ectodermo y se mueven a lo largo de la piel hacia la línea media ventral del abdomen.
- Las células de la **cresta neural vagal** y **sacra** generan los **ganglios parasimpáticos** (**entéricos**) del intestino (Le Douarin y Teillet 1973; Pomeranz y col. 1991). La cresta neural vagal (cuello) se localiza frente a los somitas 1-7 del pollo, mientras que la cresta neural sacra se localiza por detrás del somita 28. La falla en la migración de las células de la cresta neural desde estas regiones hacia el colon da como resultado la ausencia de ganglios entéricos y por esta razón la ausencia de movimientos peristálticos en el intestino grueso.
- La **cresta neural cardíaca** está localizada entre la cresta neural craneal y la del tronco. En embriones de pollo, esta región de la cresta neural se extiende desde el primero al tercer somita, superponiéndose a la porción anterior de la cresta neural vagal (Kirby 1987; Kirby y Waldo 1990). Las células de la cresta neural cardíaca pueden desarrollarse hacia melanocitos, neuronas cartílago y tejido conectivo (del tercero, cuarto y sexto arcos faríngeos). Además, esta región de la cresta neural produce la totalidad del tejido conectivo-muscular de la pared de las grandes arterias a medida que se originan desde el corazón, también contribuye al tabique (septum) que separa la circulación pulmonar de la de la aorta (Le Lièvre y Le Douarin 1975).

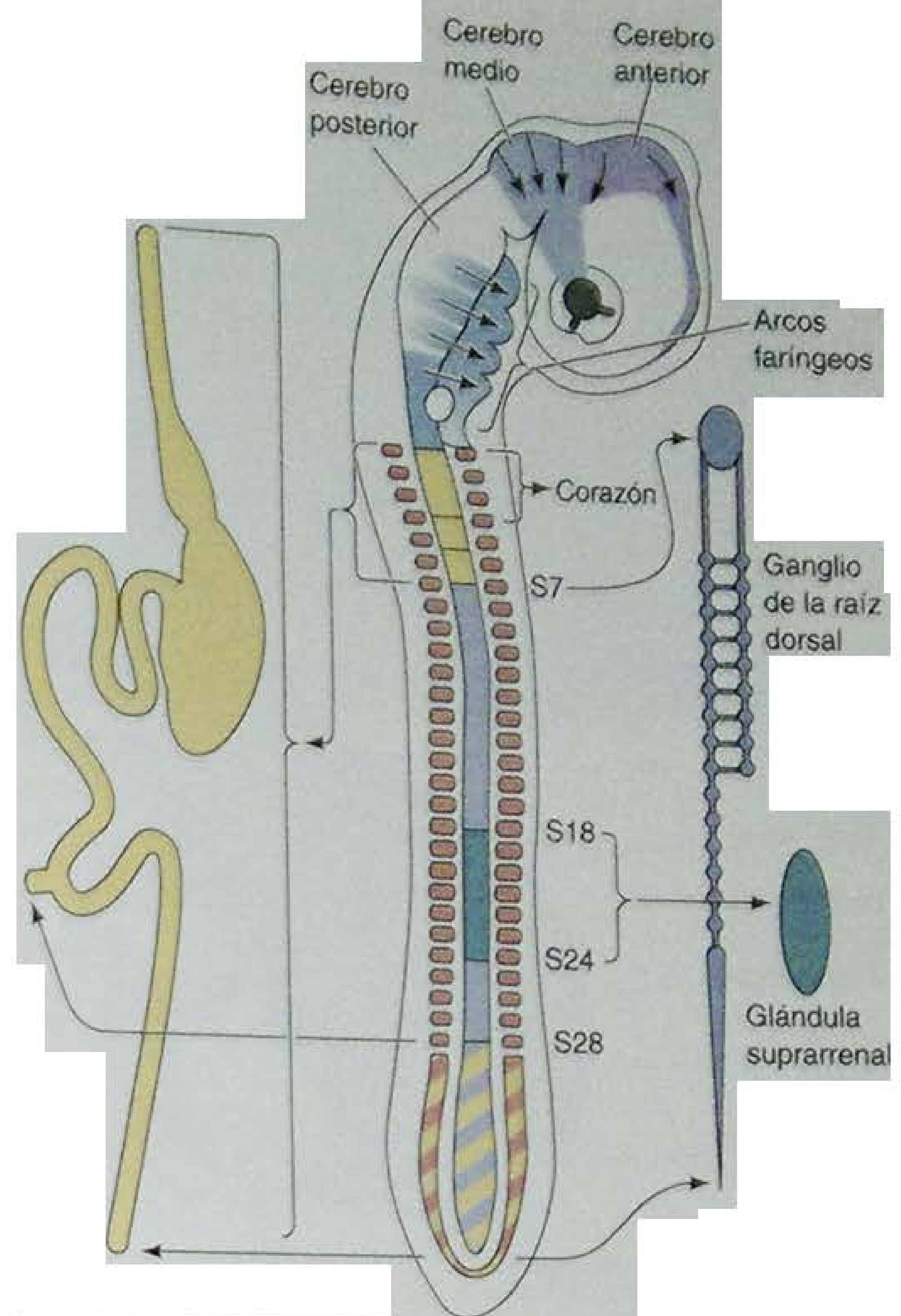


Fig. 13-2. Regiones de la cresta neural. La cresta neural craneal migra hacia los arcos faríngeos y hacia la cara para formar los huesos y los cartílagos faciales y del cuello; también produce las neuronas craneales. La cresta neural vagal (próxima a los somitas 1-7) y la cresta neural sacra (posterior al somita 28) forma las neuronas parasimpáticas del intestino. Las células de la cresta neural cardíaca se originan próximas a los somitas 1-3; son críticas en la producción de la división entre la arteria aorta y la pulmonar. Las células de la cresta neural del tronco (cerca del somita 6 hasta la cola) producen neuronas simpáticas y células pigmentarias (melanocitos) y un subgrupo de éstas (a nivel de los somitas 18-24) forman la porción medular de la glándula suprarrenal. (Según Le Douarin 1982.)

La cresta neural del tronco

Rutas migratorias de las células de la cresta neural del tronco

La cresta neural del tronco es una estructura transitoria, debido a que sus células se dispersan rápidamente poco después del cierre del tubo neural. Las células de la cresta neural del tronco migran a través de dos rutas principales (fig. 13-3A). Aquellas células que migran a lo largo de la **ruta dorsolateral** llegan a ser melanocitos, las células pigmentarias formadoras de melanina. Ellas viajan entre la epidermis y la dermis, ingresan al ectodermo a través de orificios muy pequeños en la lámina basal (que ellas han hecho). Aquí colonizan la piel y los folículos pilosos (Mayer 1973; Erickson y col. 1992). Esta ruta fue demostrada en una serie de experimentos clásicos por Mary Rawles (1948), quien trasplantó el tubo neural y la cresta desde una cepa de pollos pigmentados hacia el tubo neural de un embrión de pollo albino (véase fig. 1-11).

El mapa de destino de las células de la cresta neural ha demostrado que las células de la cresta neural del tronco también pueden tomar una **ruta ventral**. Estas células llegan a ser sensoriales (raíz dorsal) y neuronas simpáticas, células de la médula suprarrenal y células de Schwann (Weston 1963; Le Douarin y Teillet 1974). En aves y mamíferos (pero no en peces y ranas),* estas células migran

* En los peces, el tubo neural se forma por neurulación secundaria. Las células de la cresta neural surgen desde un engrosamiento ectodérmico en la región dorsal de la quilla neural. En la migración de las células de la cresta neural del pez, el esclerotoma no es importante; en su lugar, el miótomo parece ser la guía de la migración de las células de la cresta centralmente (Morin-Kensicki y Eisen 1997).

ventralmente a través de la sección anterior –pero no de la posterior– de los esclerotomas (fig. 13-3B-D; Rickmann y col. 1985; Bronner-Fraser 1986; Loring y Erickson 1987; Teillet y col. 1987). Mediante el trasplante de tubos neurales de codorniz hacia embriones de pollo, Teillet y col. pudieron marcar de manera genética e inmunológica a las células de la cresta neural. La marcación del anticuerpo reconoce y tiñe a las células de la cresta neural de ambas especies; el marcador genético permite al investigador distinguir entre las células de la codorniz y las del pollo. Estos estudios demostraron que las células de la cresta neural que inicialmente se localizaban frente a la región posterior de un somita migran hacia el extremo anterior o posterior a lo largo del tubo neural y luego ingresan en la región anterior de su propio somita o del adyacente. Estas células se unen con las células de la cresta neural

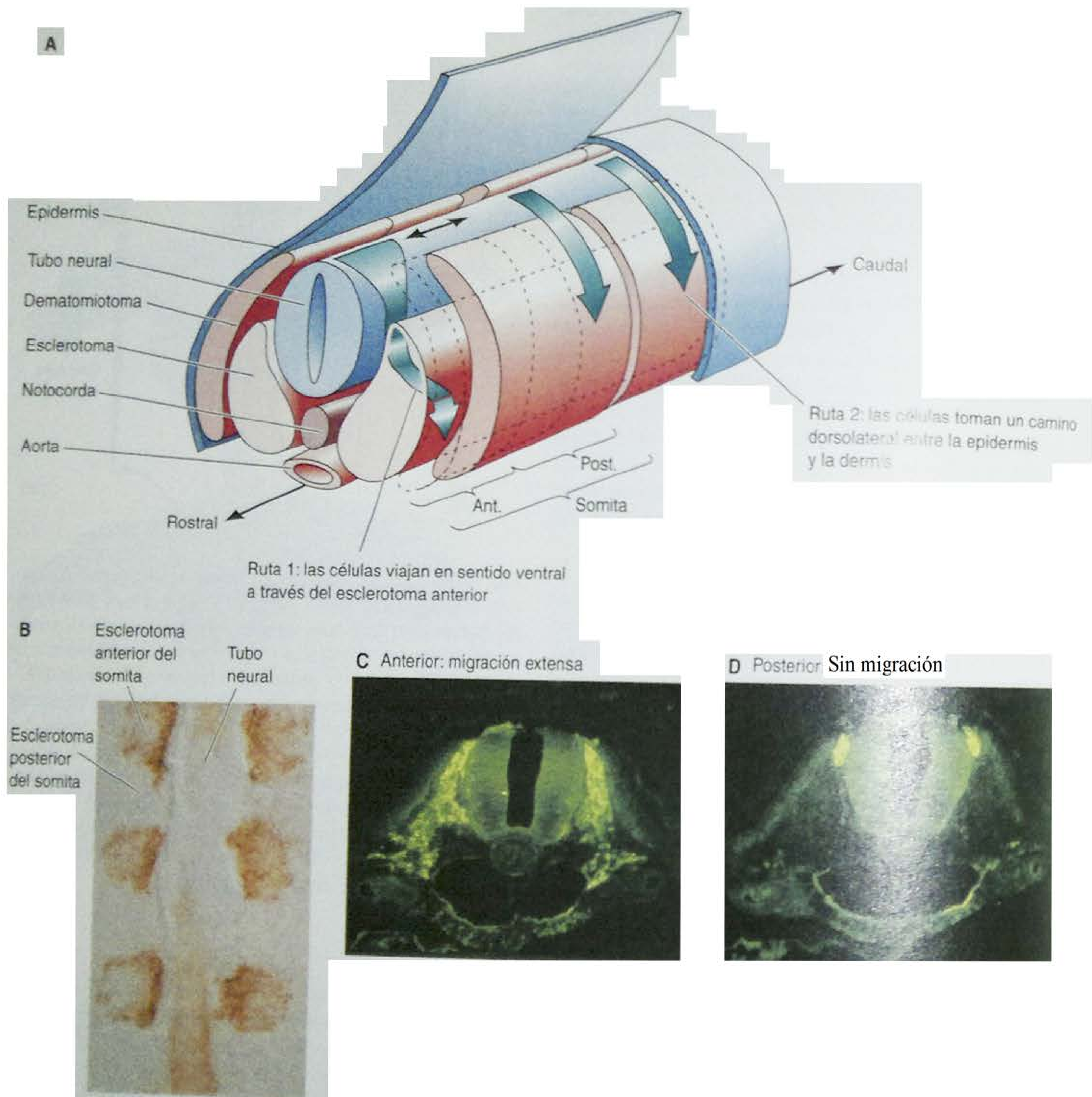


Fig. 13-3. Migración de las células de la cresta neural en el tronco del embrión de pollo. **A.** Diagrama esquemático de la migración celular de la cresta neural del tronco. Las células que toman la ruta 1 (la ruta ventral) viajan en sentido ventral a través de la parte anterior del esclerotoma (la porción del somita que genera el cartílago vertebral). Aquellas células inicialmente frente a la porción posterior de un esclerotoma migran a lo largo del tubo neural hasta que llegan frente a una región anterior. Estas células contribuyen a los ganglios simpático y parasimpático como también con las células de la médula suprarrenal y del ganglio de la raíz dorsal. Otras células de la cresta neural del tronco ingresan a través de la ruta 2 (la ruta dorsolateral) algo más tarde. Estas células viajan a lo largo de una ruta dorsolateral por debajo del ectodermo y llegan a ser melanocitos productores de pigmento. (Las rutas de migración son mostradas solamente sobre un lado del embrión.) **B.** Estas microfotografías de fluorescencia muestran las secciones longitudinales de un embrión de pollo de 2 días, teñidas de rojo con anticuerpo para HNK-1, que reconoce selectivamente a las células de la cresta neural. La extensa tinción es vista en la mitad anterior, pero no en la posterior de cada esclerotoma. **C, D.** Secciones transversales a través de estas áreas, que muestran, **C**, una extensa migración a través de la porción anterior del esclerotoma, pero **D**, sin migración a través de la porción posterior. Aquí, los anticuerpos para HNK-1 están teñidos de verde. (**B**, de Wang y Anderson 1997; **C-D**, de Bronner-Fraser 1986; microfotografías cortesía de los autores.)

que inicialmente se encontraban frente a la porción anterior del somita y forman las mismas estructuras. Por lo tanto, cada ganglio de la raíz dorsal está compuesto de tres poblaciones de células de la cresta neural: una de la cresta neural frente a la porción anterior del somita y una de cada región de la cresta neural frente a las porciones posteriores de somitas adyacentes.

Los mecanismos de la migración de la cresta neural del tronco

MIGRACIÓN DESDE EL TUBO NEURAL. Cualquier análisis de la migración (sea de aves, mariposas o células de la cresta neural) tiene que hacerse cuatro preguntas:

1. ¿Cómo se inicia la migración?
2. ¿Cómo conocen los agentes migratorios la ruta sobre la que deben viajar?
3. ¿Cuáles son las señales que indican que el destino ha sido alcanzado y que la migración debería terminar?
4. ¿Cuándo llega a ser competente un agente migratorio para responder a estas señales?

Las células de la cresta neural inician su migración desde los pliegues neurales mediante interacciones de la placa neural con la epidermis presuntiva. Las células de la cresta neural, originalmente parten de un epitelio, experimentan una transformación epitelial a mesenquimática, por medio de la cual pierden sus adhesiones con otras células y migran alejándose de la lámina epitelial. Estos cambios pueden inducirse mediante el cultivo de células de la placa neural con las proteínas morfogenéticas del hueso 4 y 7, dos proteínas que se sabe son secretadas por la epidermis presuntiva (véase cap. 12). Ante la presencia de las proteínas Wnt y FGF, BMP4 y BMP7 se induce la expresión de la proteína Slug y de la proteína RhoB en las células destinadas a convertirse en cresta neural (fig. 13-4; Nieto y col. 1994; Mancilla y Mayor 1996; Liu y Jessell 1998; LaBonne y Bronner-Fraser 1998). Si se inactiva o inhibe la formación de Slug o de Rho, las células de la cresta neural no pueden migrar desde el tubo neural.

Para que las células dejen la cresta neural, deben haber tanto empujes como tirones. La proteína RhoB puede estar involucrada en el establecimiento de las condiciones citoesqueléticas que promueven la migración (Hall 1998). En el momento de la activación, RhoB promueve la polimerización de actina hacia microfilamentos y la adhesión de estos microfilamentos a la membrana celular. Sin embargo, las células no pueden dejar el tubo neural mientras están conectadas firmemente unas con otras. Una de las funciones de la proteína Slug es la de activar los factores que disocian las uniones estrechas que están adhiriendo a las células entre sí (Savagne y col. 1997). Otro factor en la iniciación de la migración celular de la cresta neural es la pérdida de la cadherina-N que une a las células entre sí. Originalmente hallada sobre la superficie de las células de la cresta neural, esta proteína de adhesión celular es regulada en menos en el momento de la migración celular. Las células de la cresta neural del tronco en migración no tienen cadherina-N sobre sus superficies, pero ellas comienzan a expresarla nuevamente a medida que se agregan para formar a los ganglios de la

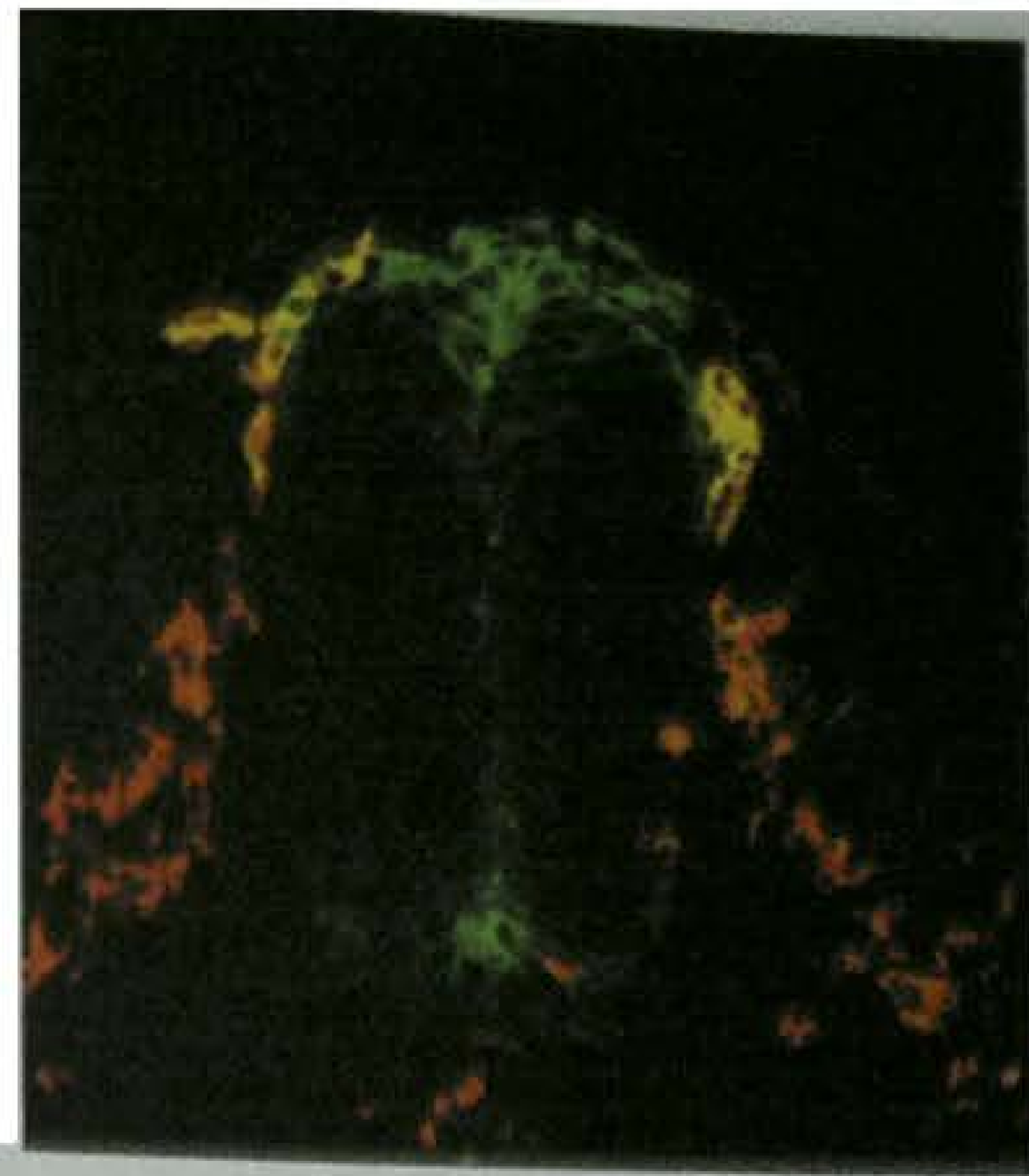


Fig. 13-4. Todas las células de la cresta neural en migración están teñidas de rojo por el anticuerpo HNK-1, como en la figura 13-3. La proteína RhoB (tinción de verde) es expresada en las células a medida que dejan la cresta neural. Las células que expresan HNK-1 y RhoB aparecen de amarillo. (Según Liu y Jessell 1998; microfotografía cortesía de T. M. Jessell.)

raíz dorsal y a los ganglios simpáticos (Takeichi 1988; Akitaya y Bronner-Fraser 1992).

RECONOCIMIENTO DE LAS MATRICES EXTRACELULARES DE ALREDEDOR. La ruta tomada por las células migratorias de la cresta neural del tronco es controlada por señales desde las matrices extracelulares que ellas encuentran a su paso (Newgreen y Gooday 1985; Newgreen y col. 1986). Pero ¿cuáles son las moléculas de la matriz extracelular que permiten o prohíben la migración? Un grupo de proteínas *promueve* la migración. Estas proteínas incluyen a la fibronectina, la laminina, la tenascina, a varias moléculas del colágeno y a los proteoglucanos y ellas son observadas a lo largo de toda la matriz con la que se encuentran las células de la cresta neural. En el momento de la migración, las células de la cresta neural del tronco del pollo comienzan a expresar la proteína integrina $\alpha 4 \beta 1$, que se une a varias de estas proteínas de la matriz extracelular. La expresión de esta molécula de integrina es necesaria para la locomoción y para la supervivencia de las células de la cresta neural recién liberadas. Sin ésta, las células dejan el tubo neural, pero se desorientan y con frecuencia experimentan apoptosis (Testaz y Duband 2001). **Trombospondina**, otra molécula de la matriz extracelular, es hallada en la porción anterior, pero no en la posterior del esclerotoma (Tucker y col. 1999). La trombospondina promueve la adhesión y la migración celulares de la cresta neural y puede cooperar con fibronectina y laminina para promover la migración de las células de la cresta neural a través de la porción anterior del somita.

Igualmente importante para el establecimiento del patrón del movimiento celular de la cresta neural son aquellas proteínas que *impiden* la migración. Las principales proteínas involucradas en la restricción de la migración celular de la cresta neural son las **proteínas efrinas**. Estas proteínas son expresadas en la región posterior de cada esclerotoma y las células de la cresta neural no van

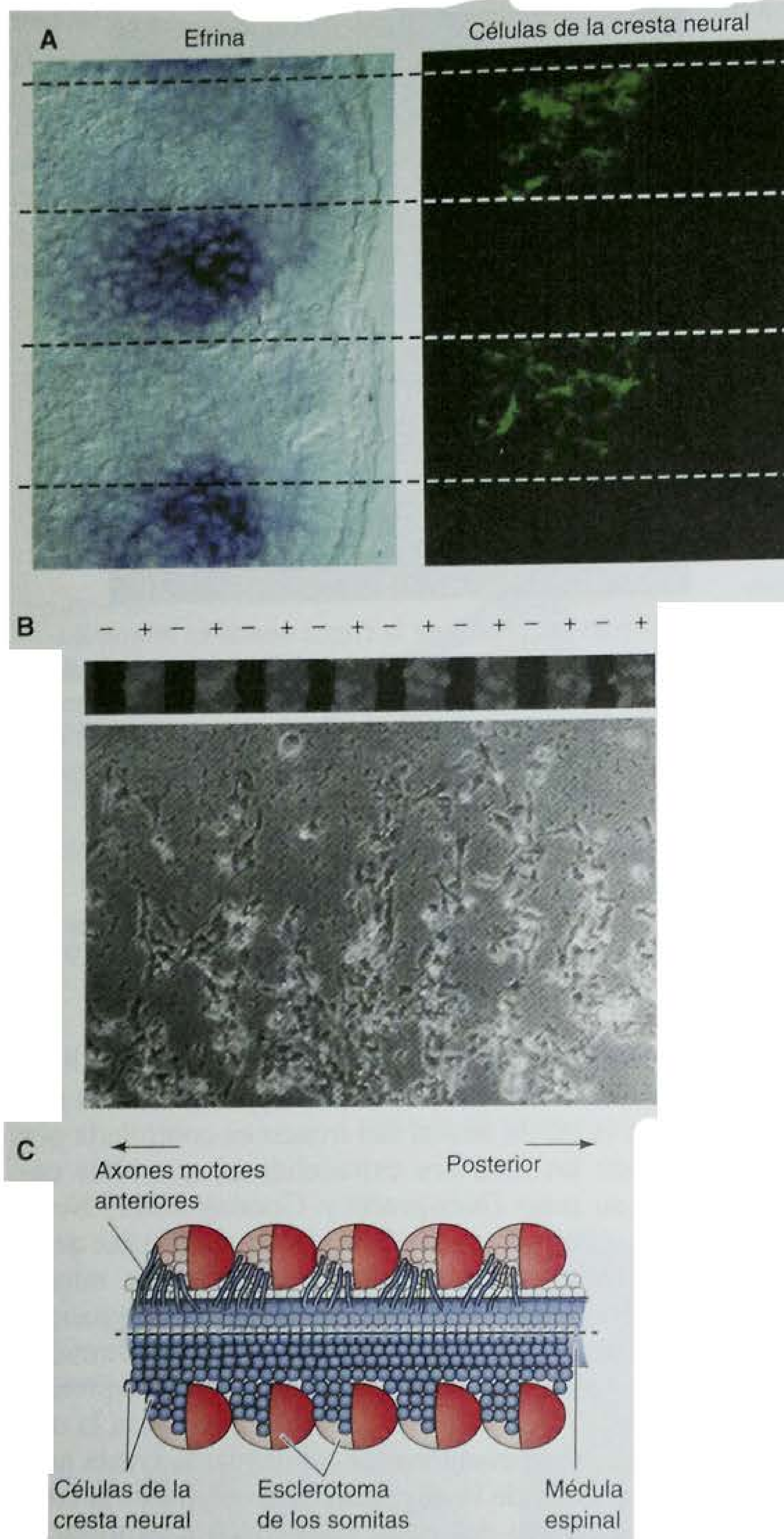


Fig. 13-5. Restricción segmentaria de las células de la cresta neural y de las neuronas motoras por las proteínas efrinas del esclerotoma. **A.** Correlación negativa entre las regiones de efrina en el esclerotoma (tinción azul oscuro, izquierda) y la presencia de células de la cresta neural (tinción verde HNK-1, derecha). **B.** Cuando las células de la cresta neural son colocadas sobre matrices que contienen fibronectina con bandas alternadas de efrina, se unen a las regiones carentes de efrina. **C.** Esquema compuesto que muestra la migración de las células de la cresta neural de la médula espinal y de las neuronas motoras a través de las regiones anteriores de los esclerotomas deficientes de efrina. (Para mayor claridad, las células de la cresta neural y las neuronas motoras son representadas solamente sobre un lado de la médula espinal.) (A y B, de Krull y col. 1997; C, según O'Leary y Wilkinson 1999.)

donde están las proteínas efrinas (fig. 13-5A). Si las células de la cresta neural son esparcidas sobre una placa de cultivo que contiene bandas alternadas de proteínas de membrana celular inmovilizadas con efrinas o sin ellas, las células dejarán las regiones que contienen efrina y se moverán a lo largo de las bandas que carecen de éstas (fig. 13-5B; Krull y col. 1997; Wang y Anderson 1997). Las células de la cresta neural reconocen a las proteínas efrinas a través de sus **receptores Eph** de transmembrana. Por lo tanto, las células de la cresta neural contienen un receptor Eph en sus membranas celulares mientras que las porciones posteriores de los esclerotomas contienen proteínas efrinas en sus membranas. La unión a las efrinas activa el dominio tirosinacinasa de los receptores Eph en las células de la cresta neural y estas cinasas probablemente fosforilan proteínas que interfieren con el citoesqueleto de actina, que es crítico para la migración celular. Además de las efrinas, otras proteínas en la porción posterior de cada esclerotoma también contribuyen a la naturaleza poco habitable de estas regiones (Krull y col. 1995). Este establecimiento de patrón de la migración celular de la cresta neural genera el carácter segmentario general del sistema nervioso periférico, reflejado en el posicionamiento del ganglio de la raíz dorsal y de otras estructuras derivadas de la cresta neural.

El factor de célula madre (mencionado en el capítulo 6) es crítico en permitir la proliferación continua de aquellas células de la cresta neural que ingresan en la piel y también puede servir como un factor anti-apoptosis y como un factor quimiotáctico. Si el factor de célula madre es secretado experimentalmente desde los tejidos, tal como el epitelio de la mejilla o de las almohadillas del pie, que normalmente no sintetizan esta proteína (y normalmente no tienen melanocitos), las células de la cresta neural entrarán en aquellas regiones y se convertirán en melanocitos (Kunisada y col. 1998). Por lo tanto, la migracion de las células de la cresta parece ser regulada por la matriza extracelular y porfactores solubles secretados en sus destinos potenciales. Como se verá más adelante en este capítulo, el movimiento del cono de crecimiento axonal también puede ser regulado por señales similares (y a veces idénticas).

SITIO WEB 13.2 **La especificidad de la matriz extracelular (The specifity of the extracellular matrix).** La importancia de la matriz extracelular para la migración celular de la cresta neural fue primero demostrada en una serie de experimentos creativos que utilizaron mutantes de salamandras.

SITIO WEB 13.3 **Mutantes de las células de la cresta neural de ratón (Mouse neural crest cell mutants).** Algunas de las aproximaciones más importantes hacia el desarrollo y migración celulares de la cresta neural provienen de estudios de ratones mutantes. Estos ratones pueden ser reconocidos por su pigmentación alterada, que resulta de anomalías de la proliferación, migración o diferenciación de las células de la cresta neural.

Diferenciación de las células de la cresta neural del tronco

LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL DEL TRONCO. Una de las características más fascinantes de las células de la cresta neural es su

pluripotencialidad. Una única célula de la cresta neural puede diferenciarse en cualquiera de los diferentes tipos celulares, según su localización dentro del embrión. Por ejemplo, las neuronas parasimpáticas formadas por las células de la cresta neural vagal (adyacentes a los somitas 1 a 7) producen acetilcolina como su neurotransmisor; ellas son por esta razón neuronas *colinérgicas*. Estas neuronas revestirán el intestino. Las neuronas simpáticas formadas por las células de la cresta neural del tronco (torácicas) producen noradrenalina, ellas son neuronas *adrenérgicas*. Pero cuando la cresta neural torácica y vagal del pollo son trasplantadas recíprocamente, la anteriormente cresta torácica produce a las neuronas colinérgicas de los ganglios parasimpáticos y la anteriormente cresta vagal forma las neuronas adrenérgicas en el ganglio simpático (Le Douarin y col. 1975). Kahn y col. (1980) hallaron que células de la cresta neural premigratorias desde ambas regiones torácica y vagal contenían enzimas para sintetizar acetilcolina y noradrenalina. Por lo tanto, la diferenciación celular de la cresta neural depende de su localización final y no de su lugar de origen.

La pluripotencialidad de algunas células de la cresta neural es tal que incluso regiones de la cresta neural, que nunca producen neuronas en embriones normales, pueden hacerlo bajo ciertas condiciones. Las células de la cresta neural craneal de la región del cerebro medio normalmente migran hacia el ojo e interactúan con la retina pigmentada para convertirse en células del cartílago escleral (Noden 1978). Sin embargo, si esta región de la cresta neural es trasplantada hacia la región del tronco, ésta puede formar neuronas del ganglio sensorial, células de la médula suprarrenal, glía y células de Schwann (Schweizer y col. 1983).

La investigación que se acaba de describir estudió el potencial de las poblaciones de las células de la cresta neural. Todavía es incierto si la mayoría de las células individuales que dejan la cresta neural es pluripotente o si la mayor parte ya está restringida a ciertos destinos. Bronner-Fraser y Fraser (1988, 1989) proporcionaron evidencia de que algunas, sino la mayoría, de las células de la cresta neural individuales son pluripotentes a medida que dejan la cresta. Ellos inyectaron moléculas de dextrán fluorescente en células individuales de la cresta neural de aves mientras las células todavía estaban por arriba del tubo neural, y luego esperaron a ver qué tipo de células llegaban a ser sus descendientes después de la migración. La progenie de una única célula de la cresta neural podía ser neurona sensorial, melanocitos, células de la médula suprarrenal y glía (fig. 13-6).

Sin embargo, el laboratorio de D. J. Anderson (Lo y col. 1997; Ma y col. 1998; Perez y col. 1999) halló evidencia de que algunas poblaciones de las células de la cresta neural son comprometidas muy rápidamente después de dejar el tubo neural y que ellas tenían factores de transcripción que limitaban los tipos celulares que podían producir. De modo semejante, Henion y Weston (1997) hallaron que la población de la cresta neural inicial era una mezcla heterogénea de precursores, en donde casi la mitad de los precursores generaron clones que contenían un solo tipo celular. Estas células comprometidas a convertirse en melanocitos estaban presentes en cuanto la célula comenzaba a migrar, pero estas células se dispersaban del tubo neural solo después que la mayor parte de los precursores neurogénicos ya lo había hecho.

Como se mencionó antes, las BMP y las Wnt están involucradas en la especificación de las células de la cresta neural. Jin y col. (2001) presentaron evidencia que indica que diferentes proporciones de estos factores pueden especificar diferentes poblaciones de células de la cresta neural. Células en migración temprana de los linajes presuntivos neural y glial secretan inhibidores de Wnt, y la colocación experimental de proteínas de Wnt sobre las células de la cresta neural expande el número de melanocitos a expensas de las células neurales y gliales. Por el contrario, BMP es regulada en menos cuando los linajes melanoblásticos salen del tubo neural. Para el linaje de melanocito, la efrina puede jugar un papel positivo en la migración celular, en lugar de tener el efecto negativo que ésta presenta para las células que se mueven ventralmente. La efrina expresada a lo largo de la ruta de migración dorsolateral bloquea la migración de las células de la cresta neural en migración temprana, pero estimula la migración de las células en migración tardía. En efecto, la señalización de Eph parece ser crítica para promover esta migración, debido a que la alteración de la señal de Eph en las células de la cresta neural en migración tardía impide su migración dorsolateral (Santiago y Erickson 2002).

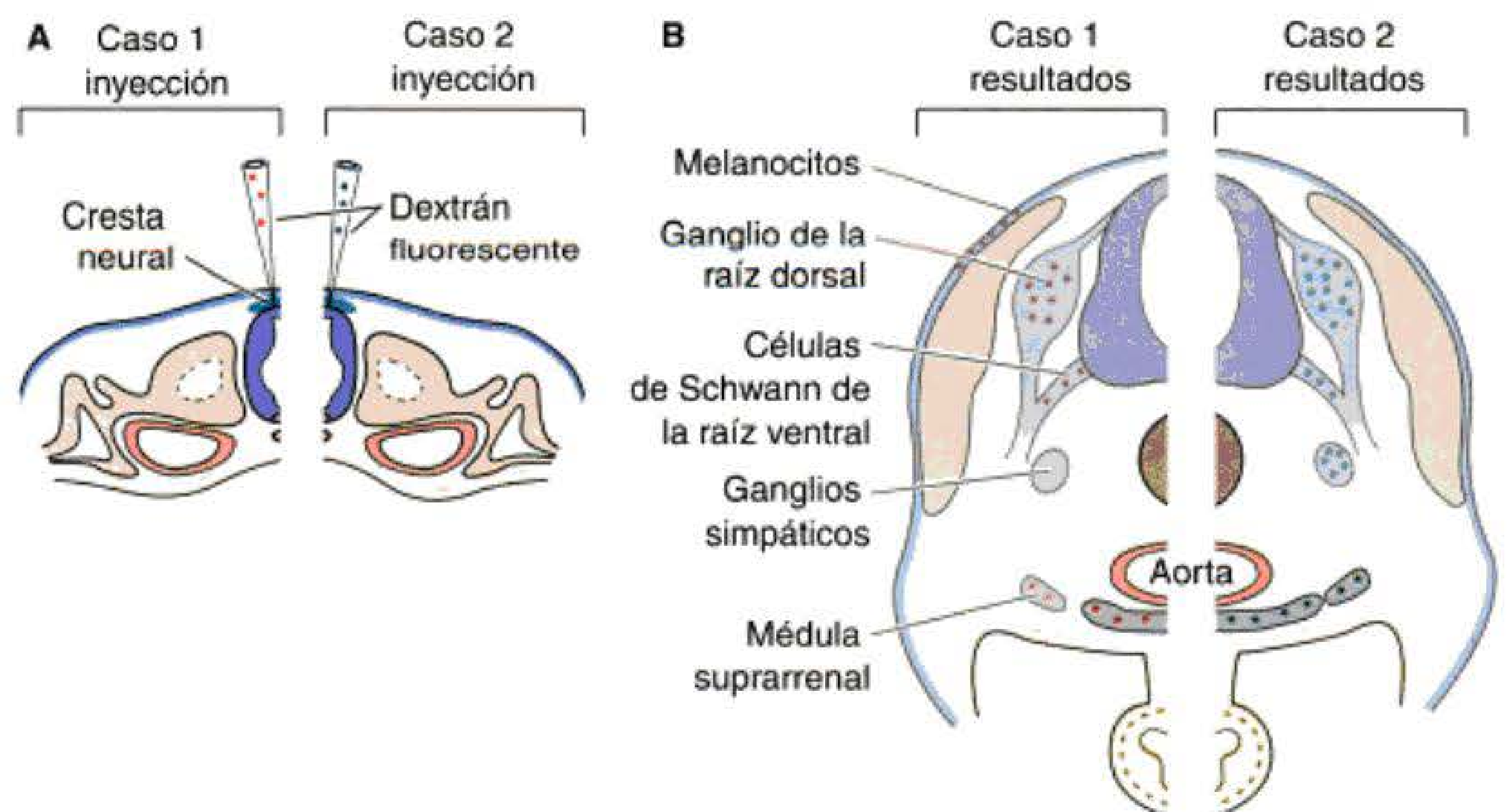


Fig. 13-6. Pluripotencialidad de las células de la cresta neural del tronco. **A.** Una única célula de la cresta neural es inyectada con dextrán altamente fluorescente poco antes de que la migración de las células de la cresta neural sea iniciada. La progenie de esta célula recibirá algo de estas moléculas fluorescentes. **B.** Dos días más tarde, los tejidos derivados de la cresta neural que contienen células marcadas con dextrán descendieron desde los precursores inyectados. La figura resume los datos de dos experimentos diferentes (caso 1 y caso 2). (Según Lumsden 1988a.)

SITIO WEB 13.4 **Células de la cresta neural comprometidas (Committed neural crest cells).** No todas las células de la cresta neural son pluripotentes. Las células de la cresta neural que dejan el tubo neural dorsal son una población heterogénea de células, algunas de ellas tienen una potencialidad restringida.

DIFERENCIACIÓN FINAL DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL DEL TRONCO. La diferenciación final de las células de la cresta neural es determinada en gran medida por el ambiente al que ellas migran. Esto no implica la muerte selectiva de las células ya comprometidas a secretar un tipo de neurotransmisor con excepción de la que fue llamada para esto (Coulombe y Bronner-Fraser 1987). Las células cardíacas, por ejemplo, secretan una proteína, el factor inhibidor de la leucemia (LIF –del inglés, *leukemia inhibition factor*), que puede convertir a las neuronas simpáticas adrenérgicas en neuronas colinérgicas sin afectar su supervivencia o crecimiento (Chun y Patterson 1977; Fukada 1980; Yamamori y col. 1989). De modo semejante, la proteína morfogenética del hueso 2 (BMP2), una proteína secretada por el corazón, los pulmones y la aorta dorsal, influye sobre las células de la cresta neural de la rata para diferenciarlas a neuronas colinérgicas. Tales neuronas forman los ganglios simpáticos en la región de estos órganos (Shah y col. 1996). Mientras que BMP2 puede inducir a las células de la cresta neural a convertirse en neuronas, el factor de crecimiento glial (GCF; del inglés, *glial growth factor*; neuregulina) suprime la diferenciación neuronal y dirige el desarrollo hacia destinos gliales (Shah y col. 1994). Otro factor paracrino, endotelina-3, parece estimular a las células de la cresta neural a convertirse en melanocitos en la piel y en neuronas adrenérgicas en el intestino (Baynash y col. 1994; Lahav y col. 1996). Para distinguir entre estos dos destinos, las células de la cresta neural que están ingresando en la piel también encuentran a las proteínas Wnt, que inhiben el desarrollo neural y promueven la diferenciación del melanocito (Dorsky y col. 1998). De modo similar, las células de la cresta neural del tronco del pollo que migran hacia la región destinada a convertirse en la médula suprarrenal pueden diferenciarse en dos direcciones. La presencia de ciertos factores paracrinos induce a estas células a convertirse en neuronas simpáticas (Varley y col. 1995), mientras que las células que también encuentran a glucocorticoides como los producidos por las células corticales de la glándula suprarrenal se diferencian hacia células cromafines (fig. 13-7; Anderson y Axel 1986; Vogel y Weston 1990). Por lo tanto, el destino de una célula de la cresta neural puede ser dirigido por el ambiente del tejido en el que se establece.

La cresta neural craneal

La cabeza, que se compone de la cara y del cráneo, es la porción anatómica del cuerpo de los vertebrados más sofisticada. Es la novedad evolutiva que separa a los vertebrados de otros deuterostomas –equinodermos, tunicados y lancetas (Northcutt y Gans 1983; Wilkie y Morris-Kay 2001). La cabeza es ampliamente el producto de la cresta neural craneal y la evolución de los maxilares, dientes y cartílago facial se produce mediante cambios en la localización de estas células (véase cap. 23). Brian Hall (2000) ha llegado a sugerir que se reconozca a la cresta neural como una cuarta capa germinativa y clasificar a los vertebrados como "cristata" –aquellos animales con una cresta neural.

Las células de la cresta neural craneal tienen un repertorio de destinos diferentes de los de las células de la cresta neural del tronco. Mientras que ambos tipos de células de la cresta neural pueden formar melanocitos, neu-

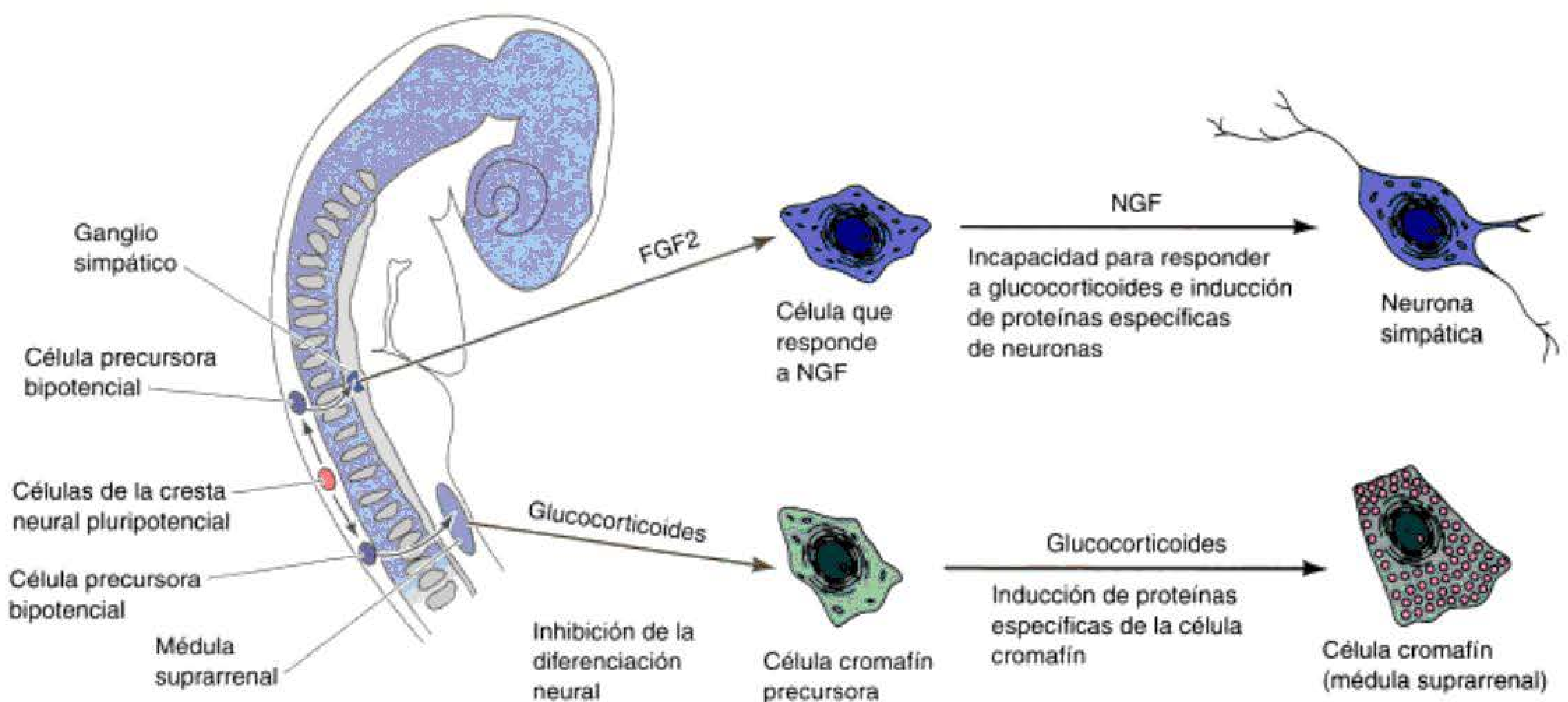


Fig. 13-7. Diferenciación final de la célula de la cresta neural del tronco comprometida a ser una célula cromafín (adrenomedular) o una neurona simpática. Los glucocorticoides parecen actuar en dos lugares en esta vía para determinar a las células cromafines. En primer lugar, inhiben las acciones de los factores que promueven la diferenciación neuronal y en segundo lugar, inducen a las enzimas características de las células cromafines. Las células expuestas secuencialmente al factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2) y al factor de crecimiento neural (NGF) se diferencian hacia neuronas simpáticas.

Cuadro 13-2 *Algunos derivados de los arcos faríngeos*

Arco faríngeo	*Elementos esqueléticos (cresta neural más mesodermo)*	*Arterias de los arcos (mesodermo)*	*Músculos (mesodermo)*	*Nervios craneales (tubo neural)*
1	Yunque y martillo (de la cresta neural); mandíbula, maxilar y regiones del hueso temporal (del mesénquima dérmico de la cresta neural)	Rama maxilar de la arteria carótida (hacia el oído, la nariz y la mandíbula)	Músculos de la mandíbula; del piso de la boca; músculos del oído y del paladar blando	Divisiones maxilar y mandibular del nervio trigeminal (V)
2	Hueso del estribo del oído medio; apófisis estiloides del hueso temporal; parte del hueso hioides del cuello (todos del cartílago de la cresta neural)	Arterias hacia la región del oído: arteria corticotimpánica (adulto); arteria estapedia (embrión)	Músculos de la expresión facial; músculos de la mandíbula y del cuello superior	Nervio facial (VII)
3	Porción inferior y asta mayor del hueso hioides (de la cresta neural)	Arteria carótida común, raíz de la carótida interna	Estilofaríngeo (para elevar la faringe)	Nervio glosofaríngeo (IX)
4	Cartílagos laríngeos (de la lámina del mesodermo lateral)	Arco de la aorta; arteria subclavia derecha; brotes originales de las arterias pulmonares	Constrictores de la faringe y cuerdas vocales	Rama laríngea superior del nervio vago (X)
6	Cartílagos laríngeos (de la lámina del mesodermo lateral)	Conducto arterioso; raíces de las arterias pulmonares definitivas	Músculos intrínsecos de la laringe	Rama laríngea recurrente del nervio vago (X)

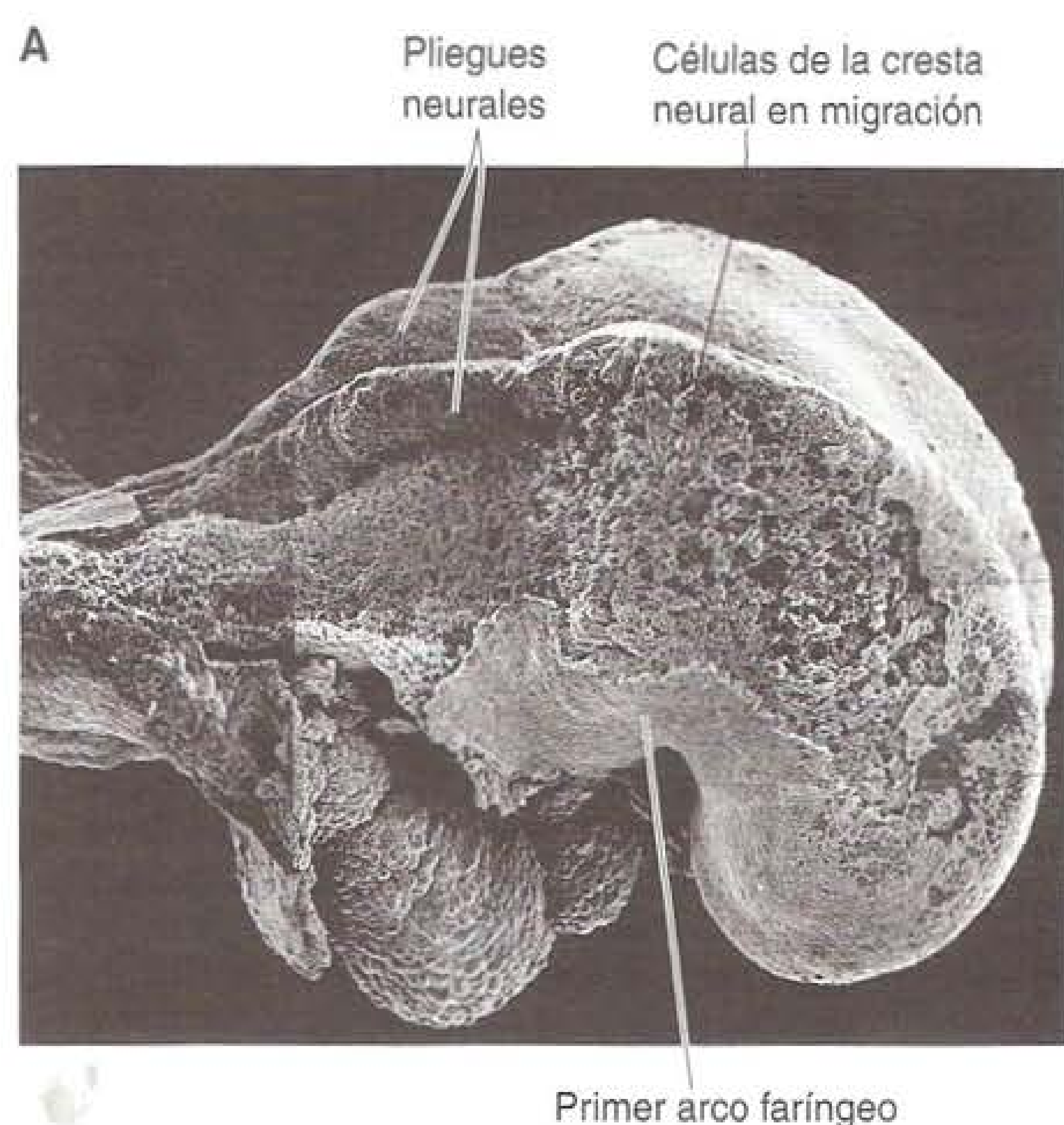
Fuente: Basado en Larsen 1992.

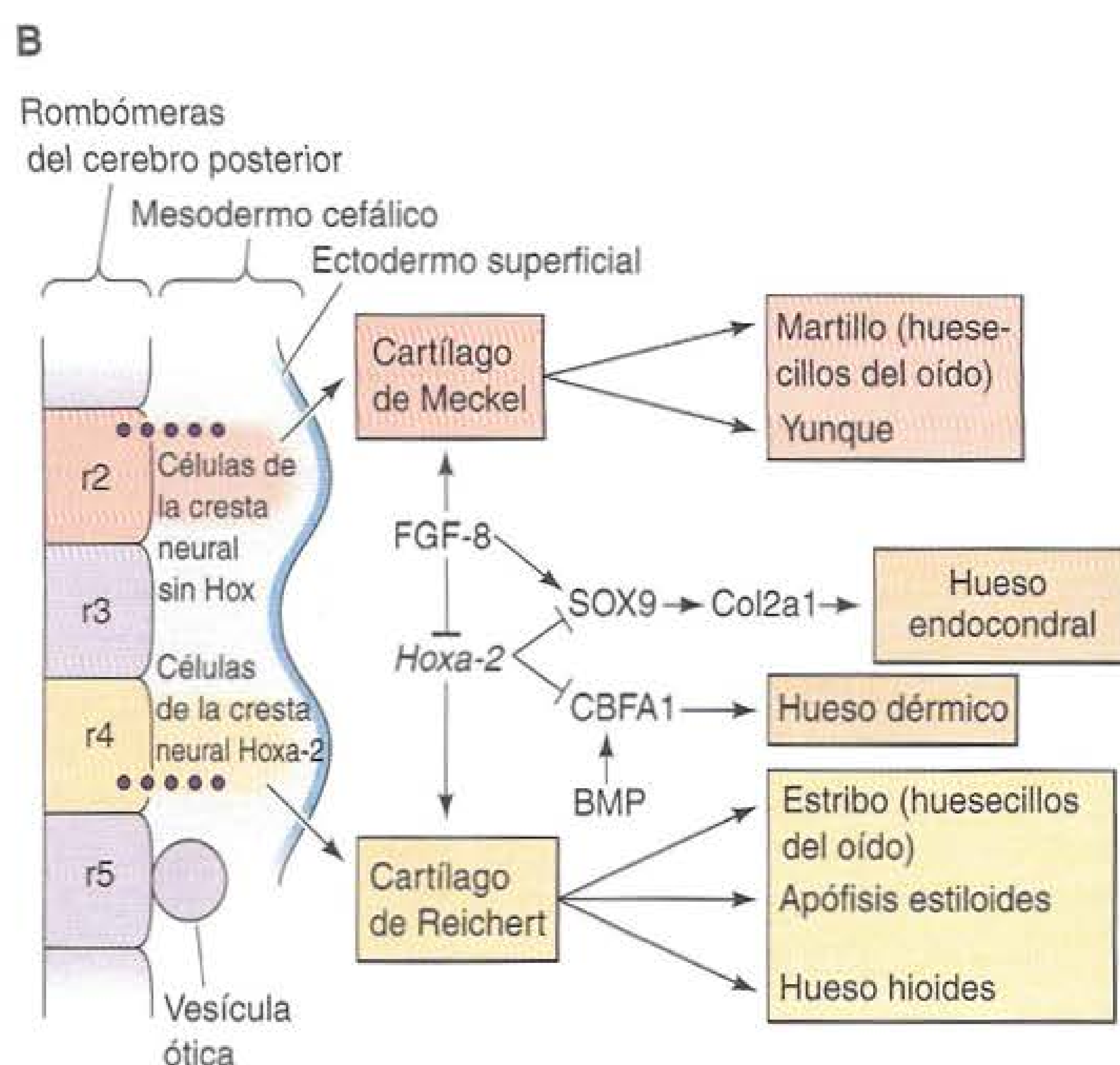
ronas y glía, solamente las células de la cresta neural craneal son capaces de producir cartílago y hueso (cuadro 13-2). Además, si es trasplantada hacia la región del tronco, la cresta neural craneal participa en la formación de cartílago del tronco que normalmente no se origina desde componentes de la cresta neural. Esta capacidad para formar hueso puede haber sido una propiedad primitiva de la cresta neural y puede haber sido crítica para la formación de corazas o protectores óseos en varias especies de peces extintos (Smith y Hall 1993). En otras palabras, la cresta del tronco aparentemente ha perdido la capacidad para formar hueso, en su lugar la cresta craneal ha adquirido esta capacidad. McGonnell y Graham (2002) han demostrado que la capacidad de formar hueso todavía puede estar latente en la cresta neural del tronco, debido a que si son cultivadas con ciertas hormonas y vitaminas, las células del tronco adquieren la capacidad para formar hueso y cartílago cuando son colocadas en la región de la cabeza.

Como se mencionó en el capítulo 12, el cerebro posterior está segmentado a lo largo del eje anteroposterior en compartimentos denominados rombómeras. Las células de la cresta neural craneal migran en sentido ventral desde las regiones anteriores a la rombómera 6, y toman una de las tres rutas principales (figs. 1-3 y 13-8):

1. Las células de la cresta neural de las rombómeras 1 y 2 migran hacia el primer arco faríngeo (el arco mandibular), formando los huesos de la mandíbula (maxilar inferior), así como los huesos del yunque y del martillo del oído. Estas células de la cresta neural también son arrastradas por el ectodermo en expansión para formar el **proceso frontonasal**. Las células de la cresta neural del proceso frontonasal generan los huesos de la cara (Le Douarin y Kalcheim 1999).
2. Las células de la cresta neural de la rombómera 4 ocupan el segundo arco faríngeo para formar el cartílago hioideo del cuello y además el hueso del estribo del oído medio.
3. Las células de la cresta neural de la rombómera 6 migran hacia el tercero y cuarto arcos y bolsas faríngeas para formar las glándulas del timo, de la paratiroides y de la tiroides. Si la cresta neural es extirpada de aquellas regiones que incluyen la rombómera 6, estas estructuras no se llegan a formar (Bockman y Kirby 1984). Algunas de las células migran caudalmente hacia la clavícula (hueso del cuello) en donde se establecen en los sitios que serán utilizados para la inserción de ciertos músculos del cuello (McGonnell y col. 2001).

Las células de la cresta neural de las rombómeras 3 y 5 no migran a través del mesodermo que las rodea, sino que ingresan en las corrientes migratorias de las células de la cresta neural a ambos lados de ellas. Aquellas que





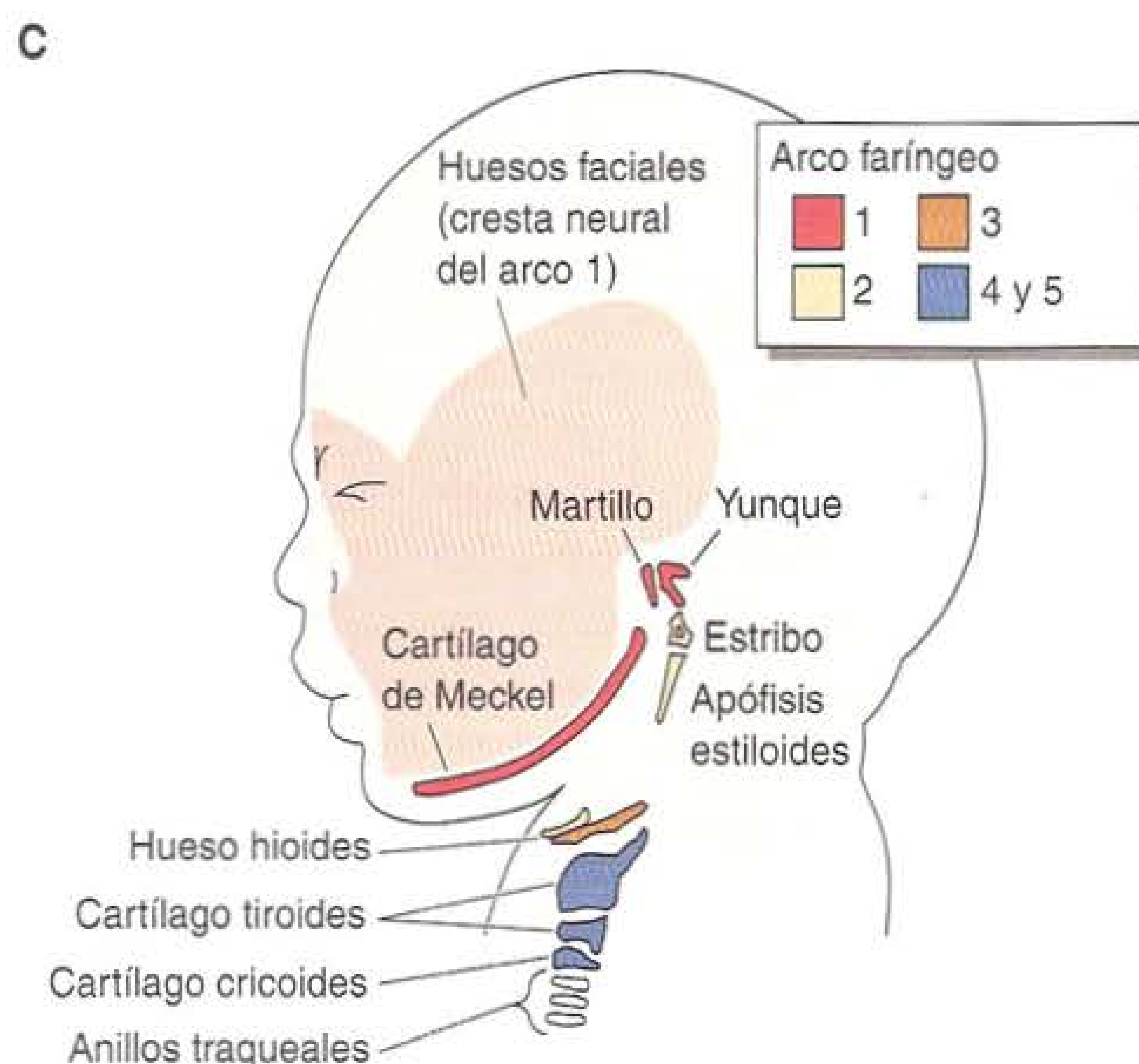


Fig. 13-8. Migración celular de la cresta neural craneal en la cabeza de mamíferos. **A.** Micrografía electrónica de barrido de un embrión de rata con parte del ectodermo lateral eliminado desde la superficie. Las células de la cresta neural en mamíferos migran previo a la fusión del tubo neural. Tal migración puede verse sobre el cerebro medio y es evidente la columna de células de la cresta neural que está migrando hacia el futuro primer arco faríngeo. **B.** La influencia del mesodermo y del ectodermo sobre la identidad axial de las células de la cresta neural craneal y el papel de Hoxa-2 en la regulación de la morfogénesis del segundo arco. Las células de la cresta neural craneal (pequeños círculos) desde la rombómera 2 no expresan genes Hox a medida que entran hacia el arco faríngeo 1. Hoxa-2 es expresado en las células de la cresta craneal que están migrando hacia el arco faríngeo 2, pero no hacia el arco faríngeo 1 y juega un papel fundamental en la imposición de la identidad del segundo arco sobre las estructuras del segundo arco. El esquema de la derecha indica las vías emergentes por las cuales Hoxa-2 interactúa con FGF8 y BMP secretados por el ectodermo para regular la morfogénesis del arco en dos arcos. **C.** Estructuras formadas en la cara humana por las células mesenquimáticas de la cresta neural. Los elementos cartilaginosos de los arcos faríngeos están indicados en colores y la región rosa oscuro indica el esqueleto facial producido por las regiones anteriores de la cresta neural. (A, de Tan y Morriss-Kay 1985; cortesía de S.-S. Tan; B, según Trainor y Krumlauf 2001; C, según Carlson 1999.)

no entran a estas corrientes de células morirán (Graham. y col. 1993, 1994; Sechrist y col. 1993). Las observaciones de células de la cresta neural del cerebro posterior del pollo marcadas, en las que células marcadas individualmente fueron seguidas por cámaras enfocando a través de una ventana de membrana de Teflón en el huevo, hallaron que las células que estaban migrando eran "mantenidas en la línea" por interacciones con su ambiente (Kulkesa y Fraser 2000). En embriones de rana, hay evidencia de que las corrientes separadas son mantenidas apartadas por efrinas. Cuando se bloquea la actividad de los receptores Eph, las células de diferentes corrientes se mezclan (Smith y col. 1997; Helbling y col. 1998).

Migración y especificación de las células de la cresta neural craneal: la primera onda de migración

Parece haber dos "ondas" de migración celular de la cresta neural craneal. La primera onda consiste en una población pluripotente de células mesenquimáticas derivada de la cresta que migra para formar el cartílago y los huesos de la cabeza y del cuello, también el tejido del estroma de los órganos faríngeos como la tiroides y el timo. Cuando las células de la cresta neural craneal *individuales* del ratón o del pez cebra son trasplantadas de una región del cerebro posterior (rombencéfalo) a otra, ellas adquieren el patrón de expresión de genes Hox característico de su región huésped (nueva) y pierden su patrón de expresión génico original. Sin embargo, si son trasplantados *grupos* de células de la cresta neural craneal, ellos tienden a conservar su identidad original (Trainor y Krumlauf 2000; Schilling 2001).

Hay interacciones recíprocas por medio de las cuales las células de la cresta neural y las regiones de los arcos faríngeos se especifican mutuamente. En primer lugar, las regiones faríngeas establecen la diferenciación de las células de la cresta neural mediante la modulación de sus genes Hox (Trainor y Krumlauf 2000; Schilling 2001). Esto determina sus destinos. A continuación, las células

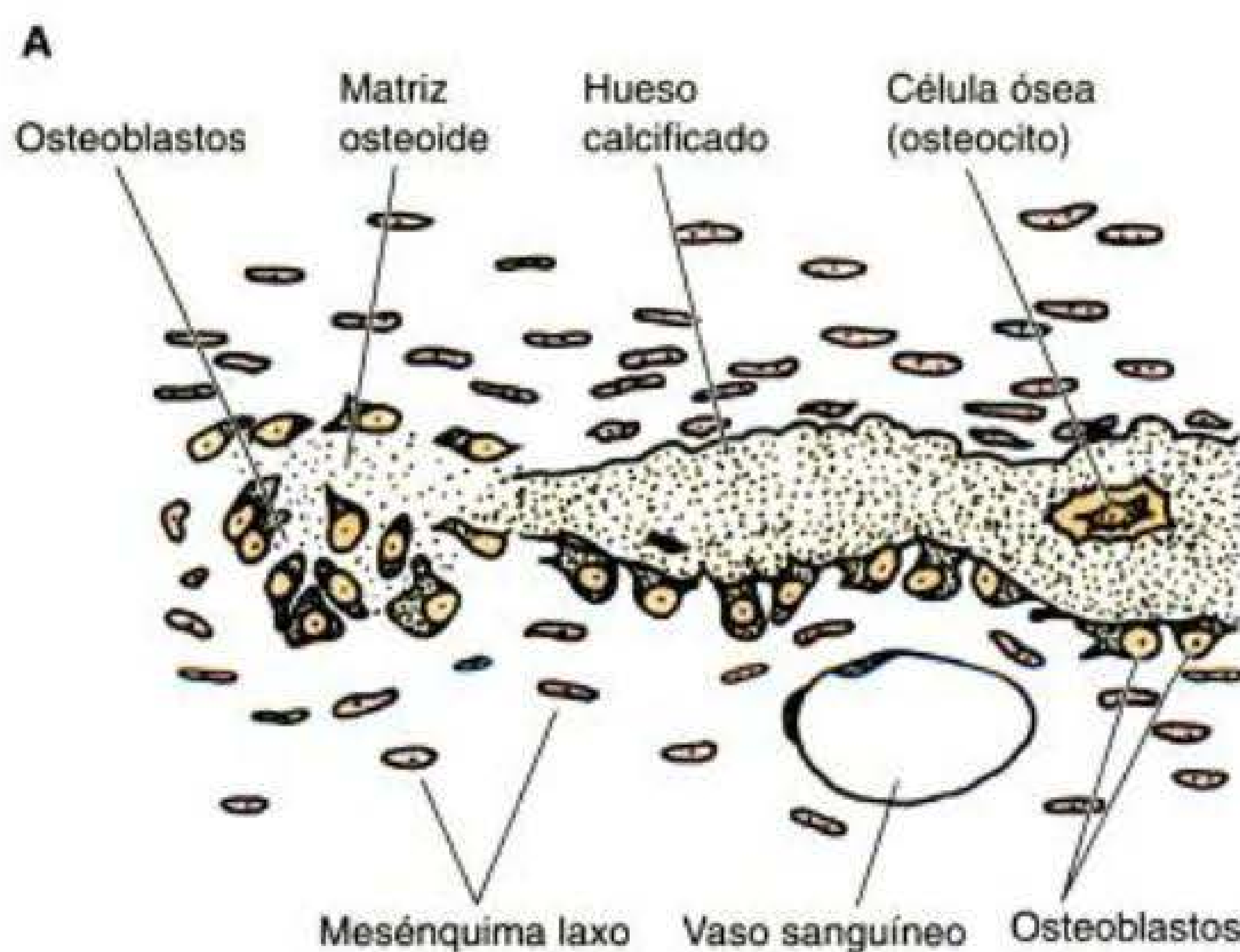
de la cresta neural instruyen la expresión génica en los tejidos de alrededor. Ésta influye en los patrones de crecimiento del arco –si la cara del ave tendrá un pico estrecho o un pico parecido a un pato (Noden 1991; Schneider y Helms 2003).

Los patrones de genes Hox de las células de la cresta neural parecen ser especificados por el mesodermo que las rodea. Las combinaciones de genes Hox expresados por el mesodermo en varias regiones de la migración de la cresta neural especifican los destinos de las células de la cresta (Trainor y Krumlauf 2001). El patrón de expresión de los genes Hox de las células de la cresta neural es crítico para sus destinos en la cabeza. Cuando se lleva a cabo la inactivación génica dirigida (knockout) de *Hoxa-2* en los embriones de ratón, las células de la cresta neural del segundo arco faríngeo generan el cartílago de Meckel, que es característico del primer arco faríngeo (Gendron-Maguire y col. 1993; Rijli y col. 1993). Por el contrario, si *Hoxa-2* es expresado ectópicamente en el primer arco, las células de la cresta neural del primer arco forman cartílago del segundo arco (Grammatopolous y col. 2000; Pasqualetti y col. 2000). Por lo tanto, *Hoxa-2* parece ser esencial para el desarrollo apropiado de los derivados del segundo arco (fig. 13-8B).

Osificación intramembranosa

Las células de la cresta neural craneal forman huesos mediante **osificación intramembranosa**. En el cráneo, las células mesenquimáticas derivadas de la cresta neural proliferan y se condensan en nódulos compactos. Algunas de estas células se desarrollan hacia capilares; otras cambian su forma y se convierten en **osteoblastos**, comprometidos a células precursoras de hueso (fig. 13-9). Los osteoblastos secretan una **matriz o sustancia osteoide** de colágeno-proteoglucano que es capaz de unir calcio. Los osteoblastos que llegan a ser embebidos en la matriz calcificada se convierten en **osteocitos**, o células óseas. A medida que avanza la calcificación, las espículas óseas irradian hacia fuera desde la región donde comienza la osificación. Además, la totalidad de la región de espículas calcificadas llega a ser rodeada por células mesenquimáticas compactas que forman el **periostio** (una membrana que rodea al hueso). Las células sobre la superficie interna del periostio también se convierten en osteoblastos y depositan matriz paralela a las espículas existentes. De este modo, se forman muchas capas de hueso.

El mecanismo de la osificación intramembranosa involucra a las proteínas morfogenéticas del hueso y la activación de un factor de transcripción denominado **CBFA1**. Se piensa que las proteínas morfogenéticas del hueso (probablemente BMP2, BMP4 y BMP7) desde la epidermis cefálica instruyen a las células mesenquimáticas derivadas de la cresta neural a convertirse en células óseas al causar directamente en ellas la expresión de CBFA1 (Hall 1988; Ducy y col. 1997). CBFA1 parece activar a los genes para la osteocalcina, la osteopontina y para otras proteínas de la matriz extracelular específicas del hueso. Esta conclusión fue confirmada mediante experimentos de inactivación génica dirigida en los cuales se hizo el knockout del gen *Cbfa1* de ratón (Komori y col. 1997; Otto y col. 1997). Los ratones homocigotas para esta deleción murieron poco después del nacimiento sin respirar, y sus esqueletos carecían completamente de hueso. (fig. 13-9B, C; los mutantes solamente tenían el molde esquelético cartilaginoso para el hueso producido mesodérmicamente que será discutido en el capítulo siguiente). Los ratones que eran heterocigotas para la supresión de *Cbfa1* mostraban defectos esqueléticos semejantes a los de un síndrome humano denominado displasia cleidocraneal (CCD; del inglés, *cleidocranial dysplasia*). En este síndrome, falla el cierre de las suturas del cráneo, el crecimiento está atrofiado y la clavícula (hue-



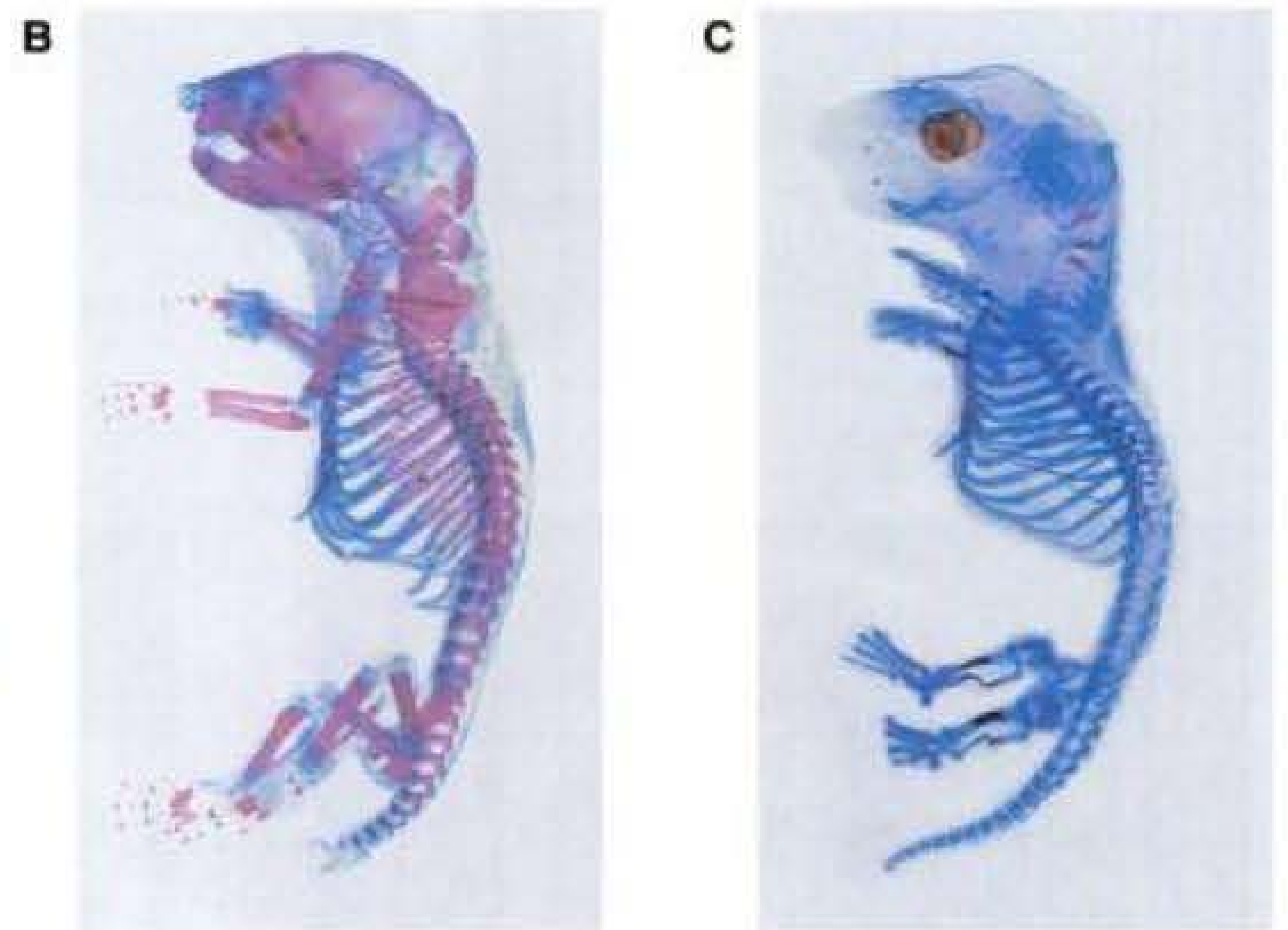


Fig. 13-9. Osificación intramembranosa. **A.** Las células mesenquimáticas se condensan y cambian de forma para producir osteoblastos, que depositan matriz osteoide. A continuación, los osteoblastos se disponen a lo largo de la región calcificada de la matriz. Los osteoblastos que están embebidos dentro de la matriz calcificada se convierten en osteocitos. **B, C.** La inactivación génica dirigida del gen *Cbfa1* en ratones evita la formación de hueso. Los ratones recién nacidos fueron teñidos con alcian blue (para cartílago) y alizarin red (para hueso). **B.** Ratón tipo salvaje. **C.** El compañero de camada mutante homocigota de *Cbfa1* muestra el desarrollo normal de cartílago, pero una ausencia de osificación en la totalidad del cuerpo. (De Otto y col. 1997; fotografías cortesía de *Cell* y MIT Press.)

so del cuello) con frecuencia está ausente o deformada.* Cuando el DNA de los pacientes fue analizado con CCD, cada paciente tenía supresiones o mutaciones puntuales en el gen *CBFA1*. Por esta razón, parece que la displasia cleidocraneal es causada por la heterocigocidad del gen *CBFA1* (Mundlos y col. 1997).

El cráneo de los vertebrados está compuesto de un neurocráneo (bóveda y base craneanas) y el viscerocráneo (los maxilares –mandíbula– y otros derivados de los arcos faríngeos). Mientras que el origen de la cresta neural del viscerocráneo ha sido bien documentado, la contribución de las células de la cresta neural craneal a la bóveda craneana ha sido más controvertida. Algunos investigadores han informado que el cráneo es derivado completamente de la cresta neural (Couly y col. 1993), mientras que otros (Le Lièvre 1978; Noden 1978, 1983) han informado que los huesos del cráneo son derivados de la cresta neural y del mesodermo cefálico. En 2002, Jiang y col. se esforzaron para resolver esta polémica mediante la utilización de procedimientos no quirúrgicos que marcaban específicamente a las células de la cresta neural craneal. Ellos construyeron ratones transgénicos que expresaban solamente β-galactosidasa en sus células de la cresta neural craneal.* Estas células virarían a un azul profundo cuando fueran teñidas para β-galactosidasa. Cuando los ratones embrionarios se tiñeron, las células que formaban la mayor parte del cráneo –los huesos nasal, frontal, esfenoides y escamoso del temporal– viraban hacia el azul; pero el hueso parietal no lo hacía (fig. 13-10). Es aparente, entonces, que mientras la mayor parte del cráneo es derivado de la cresta neural craneal, al menos un hueso principal, el hueso parietal, es producido desde el mesodermo cefálico.

* CCD puede haber sido responsable del fenotipo de Thersites, el soldado griego descrito en la *Ilíada* que tenía "los hombros curvados juntos, curvados sobre su pecho excavado y meneándose sobre ellos su cráneo combado en un punto..." (Dickman 1997).

* Estos experimentos fueron realizados utilizando la técnica Cre-Lox (véase cap. 5). Los ratones eran heterocigotas para 1) el alelo β-galactosidasa que podía ser expresado solamente cuando la Cre-recombinasa era activada en esta célula, y 2) un alelo Cre-recombinasa fusionado al promotor de *Wnt1*. Por lo tanto, el gen de la β-galactosidasa era activado (tinción azul) solamente en aquellas células que expresaban Wnt1, una proteína que es activada en la cresta neural craneal y en ciertas células del cerebro.

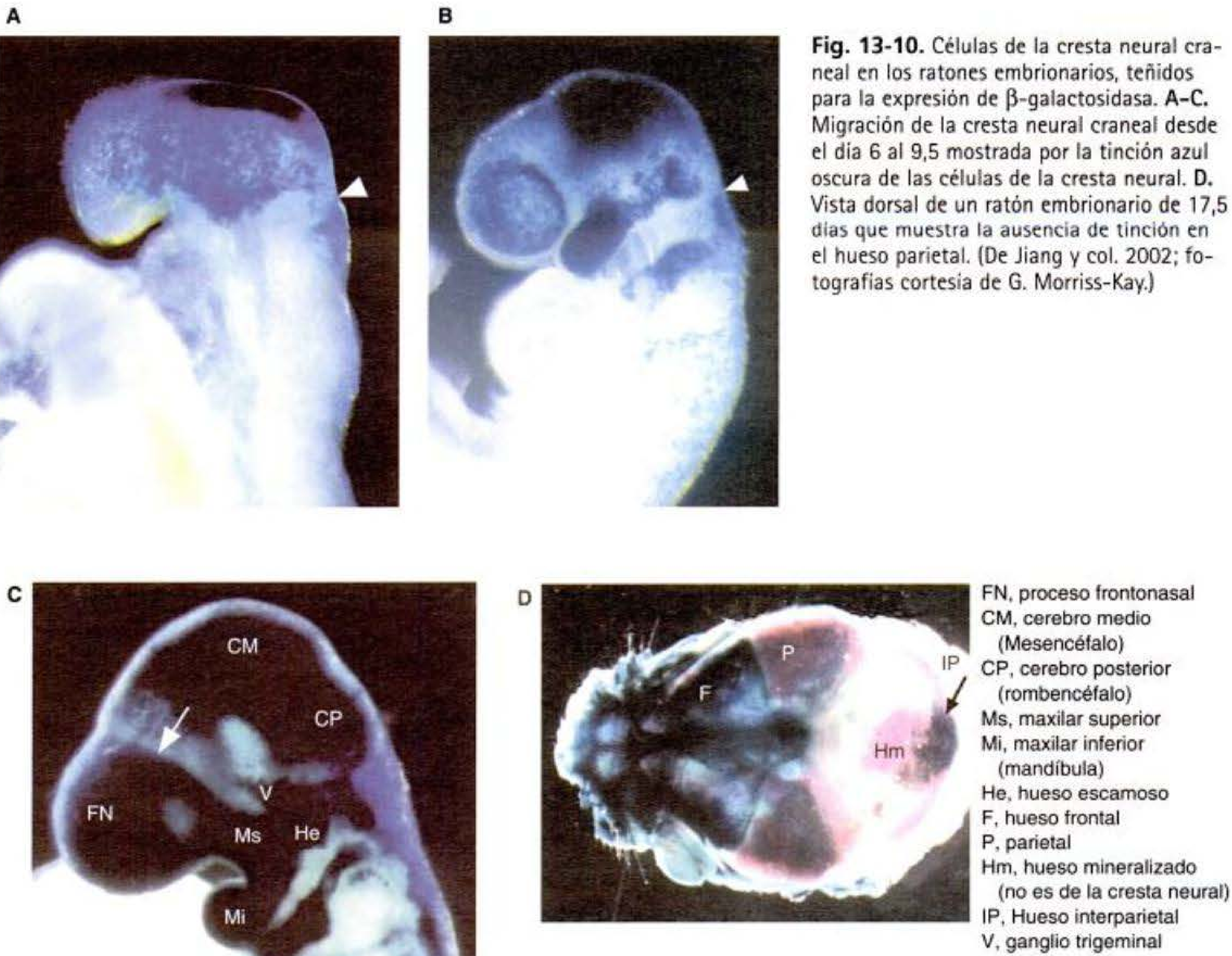


Fig. 13-10. Células de la cresta neural craneal en los ratones embrionarios, teñidos para la expresión de β-galactosidasa. **A–C.** Migración de la cresta neural craneal desde el día 6 al 9,5 mostrada por la tinción azul oscura de las células de la cresta neural. **D.** Vista dorsal de un ratón embrionario de 17,5 días que muestra la ausencia de tinción en el hueso parietal. (De Jiang y col. 2002; fotografías cortesía de G. Morriss-Kay.)

FN, proceso frontonasal
CM, cerebro medio (Mesencéfalo)
CP, cerebro posterior (rombencéfalo)
Ms, maxilar superior
Mi, maxilar inferior (mandíbula)
He, hueso escamoso
F, hueso frontal
P, parietal
Hm, hueso mineralizado (no es de la cresta neural)
IP, Hueso interparietal
V, ganglio trigeminal

Inervación de las placodas: la segunda onda de migración de la cresta neural craneal

Además de las células de la cresta neural craneal, los bordes anteriores entre el ectodermo epidérmico y neural también forman las **placodas craneales**, engrosamientos transitorios y localizados del ectodermo en la cabeza y en el cuello. Las placodas craneales son componentes críticos del sistema nervioso sensorial en la cabeza y dan origen al aparato sensorial de la nariz, oídos y receptores del gusto, así como al cristalino del ojo (que a diferencia de los anteriores no es un receptor sensorial) (fig. 13-11A, B; veáse Baker y Bronner-Fraser 2001). La cresta neural craneal y las placodas craneales pueden haberse originado desde la misma población celular durante la evolución temprana de los vertebrados (Notthcutt y Gans 1983; Baker y Bronner-Fraser 1997). Las placodas son inducidas por los tejidos vecinos. Por ejemplo, la placoda ótica, que se desarrolla hacia las células sensoriales del oído interno, es inducida en la región del ectodermo donde la placa neural presuntiva se encuentra con la epidermis presuntiva. Aquí, FGF19 del mesodermo subyacente es recibido por la vesícula ótica presuntiva y la placa neural adyacente. La placa neural es inducida a expresar y secretar Wnt8c y más FGF19. FGF19 y Wnt8c actúan sinérgicamente para inducir la formación de la placoda ótica (fig. 13-11C; Ladher y col. 2000).

Las placodas epibranquiales se forman dorsalmente hacia donde las bolsas faríngeas contactan con la epidermis. Estas estructuras se separan para formar las placodas del geniculado, del petroso y del nodoso que darán origen a las neuronas sensoriales de los nervios facial, glosofaríngeo y vagal, respectivamente. Pero ¿cómo hacen estas neuronas, producidas en estas placodas, para encontrar su camino hacia el cerebro? Las células de la cresta neural craneal en la segunda "onda" de migración no viajan ventralmente para entrar en los arcos faríngeos; sino que, migran dorsalmente para formar células gliales (Weston y Butler 1966; Baker y col. 1997). Esta glía forma los senderos que guían a las neuronas desde las placodas epibranquiales hacia el cerebro posterior (rombencéfalo) (Begbie y Graham 2001). Las conexiones producidas por estas neuronas permiten que sean apreciados el gusto y otras sensaciones faríngeas. Si no se producen estas rutas de las células gliales, las neuronas sensoriales desde las placodas no encontrarán su camino hacia el rombencéfalo. Por lo tanto, las células gliales producidas por la segunda onda de migración de la cresta neural craneal es crítica en la organización de la inervación del cerebro posterior (rombencéfalo).

SITIO WEB 13.5 **Síndromes de desarrollo facial humano (Human facial development syndromes).** Varios síndromes humanos causan anomalías de la migración de las células de la cresta neural craneal. Una región sobre el cromosoma 22 parece ser especialmente importante en la regulación del desarrollo facial y faríngeo normal.

SITIO WEB 13.6 **Síndrome de Kallmann (Kallman syndrome).** Algunos hombres infértiles no tienen sentido del olfato. La relación entre el sentido del olfato y la infertilidad humana fue difícil de alcanzar hasta que se identificó el gen para el síndrome de Kallmann. Este gen produce una proteína que es necesaria para la migración adecuada desde la placoda olfatoria de los axones olfatorios y de las neuronas secretoras de hormona.

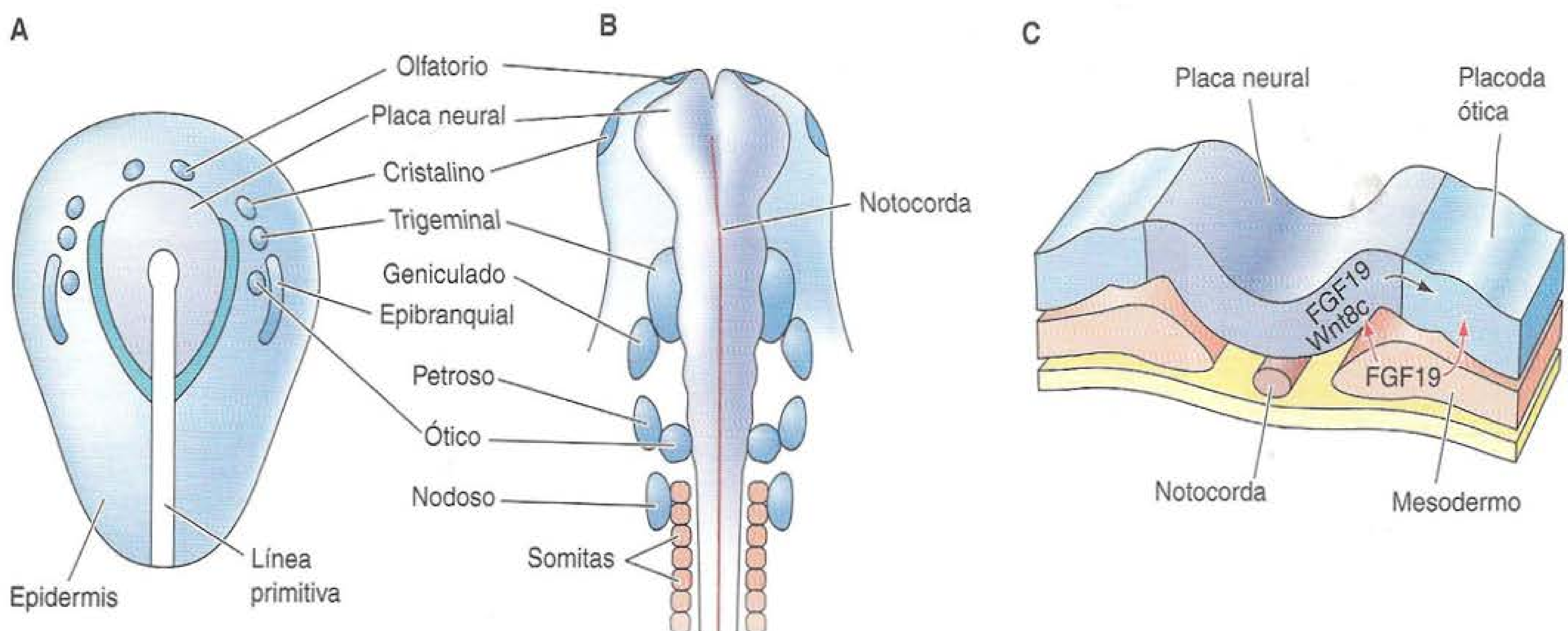


Fig. 13-11. Mapa de destino de las placodas craneales en el embrión de pollo en desarrollo. **A.** Estadio de placa neural. **B.** Estadio de 8 somitas. **C.** Inducción de la placoda ótica (oído interno). El mesodermo subyacente secreta FGF19, que es recibido por la placoda ótica prospectiva y la placa neural adyacente. La placa neural es instruida por FGF19 para secretar Wnt8c y más FGF19. Estos dos factores paracrinos funcionan sinérgicamente para inducir *Pax2* y otros genes que les permiten a las células producir la placoda ótica y convertirse en células sensoriales. (Según Ladher y col. 2000.)

Información adicional y especulaciones

Desarrollo del diente

Durante la morfogénesis de cualquier órgano, tienen lugar numerosos diálogos entre los tejidos interactuantes. En las interacciones epitelio-mesenquimáticas, el mesénquima influye sobre el epitelio; el tejido epitelial, una vez modificado por el mesénquima, puede secretar factores que cambian al mesénquima. Tales interacciones continúan hasta que se forma un órgano, con células mesenquimáticas específicas del órgano y epitelio específico del órgano. Algunas de las interacciones epitelio-mesenquimáticas más profundamente estudiadas son las que forman el diente de los mamíferos. Aquí, las células mesenquimáticas derivadas de la cresta neural llegan a ser **odontoblastos** secretores de dentina, mientras que el epitelio de la mandíbula (maxilares superior e inferior) se diferencia a **ameloblastos** secretores de esmalte. Este proceso puede verse con el empleo de la técnica Cre-lox para ratones transgénicos mencionada antes, por medio de la cual las células de la cresta neural craneal se tiñen de azul (fig. 13-12. Chai y col. 2001).

El desarrollo del diente comienza cuando el epitelio de ambos maxilares (mandíbula) hace que el **ectomesénquima** derivado de la cresta (es decir, mesénquima producido desde el ectodermo) se condense en sitios específicos. La polaridad del epitelio mandibular está determinada por interacciones entre BMP4, que está localizado distalmente y FGF8, que está situado proximalmente (cercano al cráneo). Aquellos dientes formados en las regiones de FGF8 se convertirán en molares, mientras que los dientes que se desarrollan en las regiones de BMP4 llegarán a ser los incisivos (Tucker y col. 1998). Un poco más tarde, cambia el patrón de expresión de BMP4 y de FGF8 y los sitios de los primordios del diente son determinados por interacciones entre las mismas moléculas en el epitelio. FGF8 induce la expresión de Pax9 en el ectomesénquima subyacente, mientras que BMP4 inhibe la expresión de Pax9. Pax9 es un factor de transcripción cuya expresión en el ectomesénquima es crítica para el inicio de la morfogénesis del diente y en los ratones deficientes de Pax9, el desarrollo del diente se detiene tempranamente. Los únicos lugares donde el ectomesénquima se condensa y los dientes se desarrollan son aquellos donde FGF8 está presente y las BMP están ausentes (Vainio y col. 1993; Neubüser y col. 1997). Por lo tanto, se desarrolla un espacio entre los dientes.

En este momento, el epitelio posee el potencial para generar las estructuras del diente a excepción de varios tipos de células mesenquimáticas (Mina y Kollar 1987; Lumsden 1988b). Sin embargo, este potencial formador de diente es rápidamente transferido al ectomesénquima que se ha condensado por debajo de él. Estas células ectomesenquimáticas forman la **papila dental** y ahora son capaces de inducir

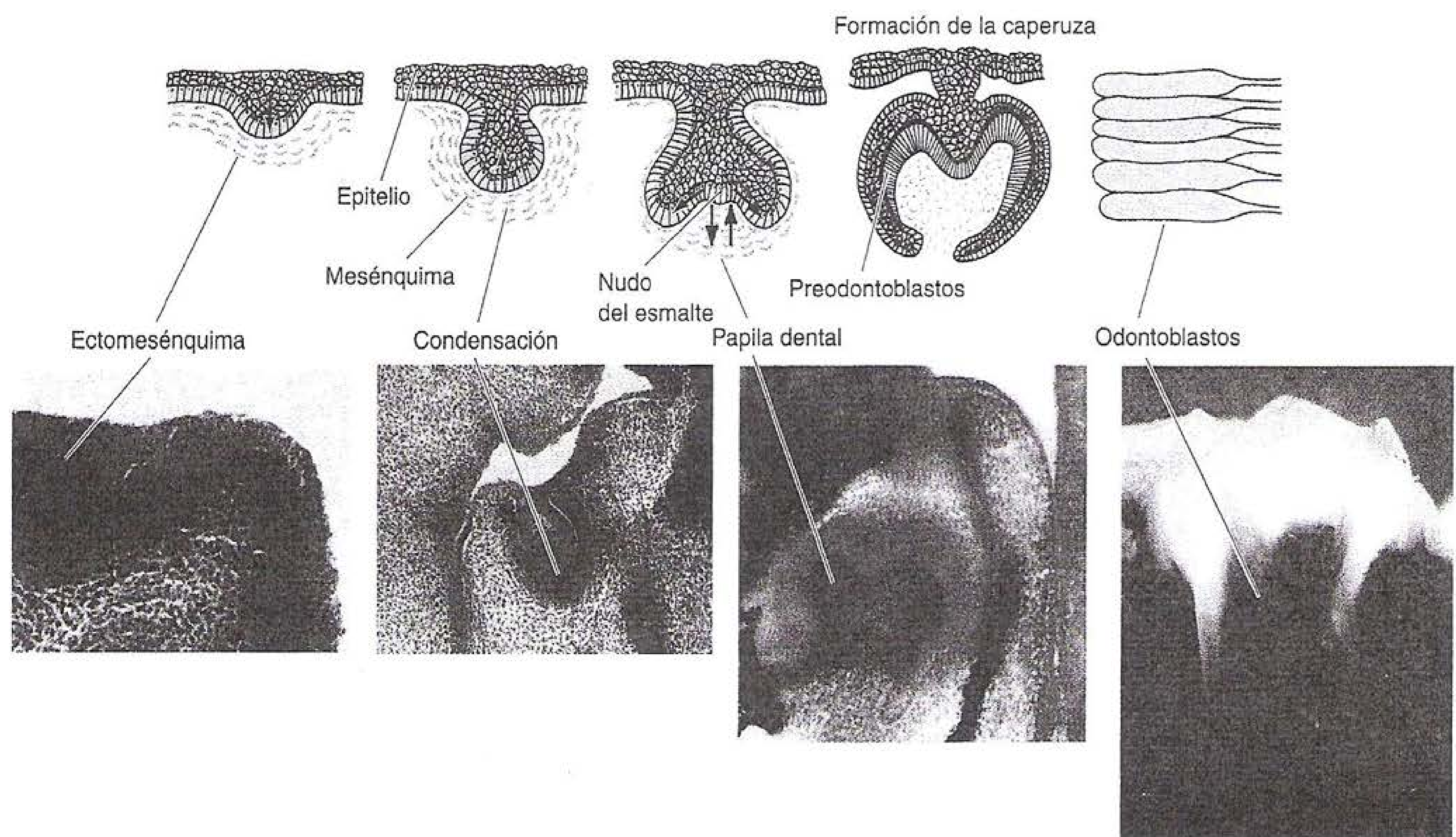


Fig. 13-12. Cambios en la población celular de la cresta neural craneal a medida que se forman los dientes. Originalmente, el ectomesénquima de la cresta neural induce y mantiene una placoda ectodérmica. La placoda crece y hace que las células del mesénquima se condensen por debajo de ésta. Las células del mesénquima empujan hacia la protrusión ectodérmica para crear la papila dental. Estas células se convierten en los odontoblastos de los dientes y llegan a ser parte de la pulpa formadora de dentina. Las figuras que están por debajo muestran a las células de la cresta neural teñidas de azul; el ectodermo ha sido contrateñido de rosa. (Según Thesleff y Sahlberg 1996; fotografías de Chai y col. 2000, cortesía de Y. Chai.)

la morfogénesis del diente en otros epitelios (Kollar y Baird 1970). En este estadio el epitelio de la mandíbula ha perdido su capacidad para instruir la formación del diente en otros mesénquimas Por lo tanto, el "potencial odontogénico" se ha trasladado desde el epitelio al mesénquima. Esta transferencia en el potencial odontogénico coincide con un cambio en la síntesis de BMP4 desde el epitelio hacia el ectomesénquima.

A medida que las células mesenquimáticas dentales se condensan, son inducidas a sintetizar la proteína de membrana sindecam y la proteína de la matriz extracelular tenascina. Estas proteínas (que pueden unirse entre sí) aparecen en el momento en el que el epitelio induce la condensación mesenquimática. Thesleff y col. (1990) han propuesto que estas dos moléculas podrían interactuar para dar lugar a esta condensación. Además, después de que se ha condensado el ectomesénquima, éste comienza a secretar BMP4 como también otros factores de crecimiento y diferenciación (FGF3, BMP3, HGF, y activina) (Wilkinson y col. 1989; Thesleff y Sahlberg 1996). Estas proteínas desde el ectomesénquima inducen una estructura crítica en el epitelio. Esta estructura es denominada el **nudo del esmalte** y funciona como el principal centro señalizador para el desarrollo del diente (Jernvall y col. 1994). Este grupo de células aparece como una población que no se divide en el centro de la caperuza en crecimiento. Mediante hibridación in situ se ha demostrado que el nudo del esmalte es una fuente de secreción de Sonic hedgehog, FGF4, BMP7, BMP4 y BMP2 (fig. 13-13; Koyama y col. 1996; Vaahtokari y col. 1996a). A medida que la población de células que no están dividiéndose secretan factores de crecimiento capaces de ser recibidos por el epitelio y el mesénquima, se piensa que el nudo del esmalte dirige la morfogénesis de la caperuza del diente y parece ser crítico en dirigir los cambios evolutivos de la estructura del diente en mamíferos (Jernvall 1995).

A medida que las células del mesénquima dental comienzan a diferenciarse a odontoblastos, es inducida la expresión de tenascina en niveles más elevados y en los mismos sitios de expresión de la fosfatasa alcalina. Estas dos proteínas han sido asociadas con la diferenciación de hueso y de cartílago, y ellas pueden promover la mineralización de la matriz extracelular (Mackie y col. 1987). Por último, a medida que surgen los fenotipos de los odontoblastos, se secretan osteonectina y colágeno tipo I como componentes de la matriz extracelular. El nudo del esmalte desaparece por apoptosis, en respuesta a su propia señal de BMP4 (Vaahtokari y col. 1996b; Jernvall y col. 1998). Mediante este proceso como una etapa, las células de la cresta neural craneal de la mandíbula (maxilares) son transformadas hacia odontoblastos secretores de dentina.

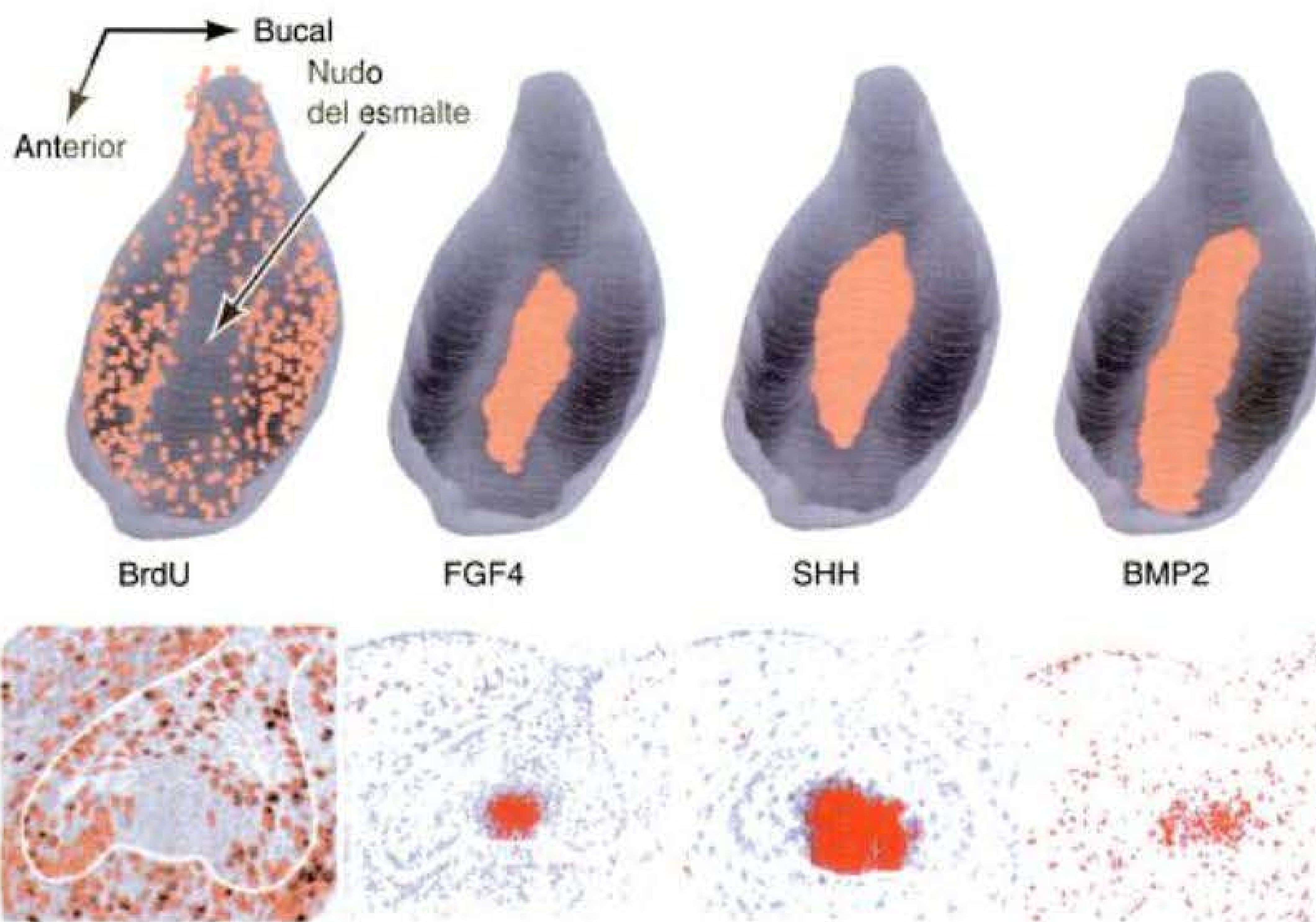


Fig. 13-13. Concentración de los factores paracrinos de crecimiento y diferenciación en la región donde se está produciendo la morfogénesis y la diferenciación en el molar inferior en el día embrionario 14,5. El límite del epitelio del diente se muestra en blanco. Los factores paracrinos están siendo secretados por el nudo del esmalte, una masa de células epiteliales que no se están dividiendo. (La concentración de BrdU muestra que las células del nudo dentario no están replicando DNA.) Cada fotografía de hibridación in situ de arriba es una reconstrucción serial del área de expresión del gen. (De Jernvall 1995; fotografías cortesía de A. Vaahtokari, J. Jernvall e I. Thesleff.)

La cresta neural cardíaca

El corazón se forma en principio en la región del cuello, directamente debajo de los arcos faríngeos, de modo tal que no debe sorprender que éste adquiera células desde la cresta neural. Sin embargo, la contribución de la cresta neural al corazón solo ha sido apreciada de manera reciente. La región caudal de la cresta neural craneal es a veces denominada la cresta neural cardíaca, debido a que sus células (y solo estas células particulares de la cresta neural) generan el endotelio de las arterias del arco aórtico y el tabique entre la arteria aorta y la pulmonar (fig. 13-14; Kirby 1989; Kuratani y Kirby 1991; Waldo y col. 1998).

En ratones, las células de la cresta neural cardíaca se caracterizan porque expresan Pax3. Las mutaciones de *Pax3* dan como resultado pocas células de la cresta neural cardíaca. Esta condición tiene como resultado un tronco arterioso persistente (la falla de separación de la arteria aorta y de la pulmonar), así como defectos en las glándulas del timo, de la tiroides y de la paratiroides (Conway y col., 1997, 2000). Con frecuencia, las cardio-

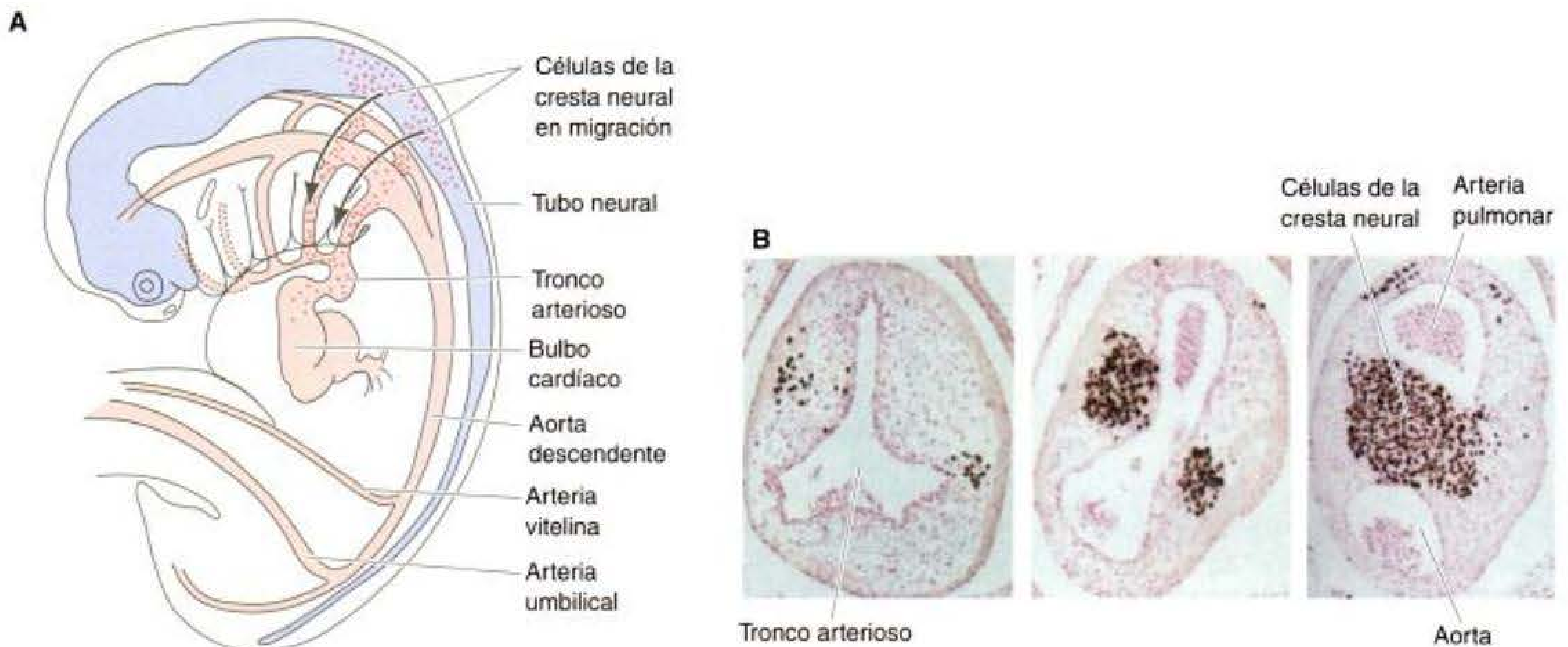


Fig. 13-14. El tabique troncoconal, que separa el tronco arterioso en arteria pulmonar y aorta, se forma desde las células de la cresta neural cardíaca. **A.** Las células de la cresta neural cardiaca migran hacia los arcos faríngeos 4 y 6 durante la quinta semana de gestación y entran al tronco arterioso para generar el tabique. **B.** Células de la cresta cardíaca de codorniz fueron trasplantadas hacia la región análoga de un embrión de pollo, y se permitió el desarrollo de los embriones. Las células de la cresta neural cardiaca de la codorniz pueden reconocerse mediante un anticuerpo específico para codorniz, que las tiñe de oscuro. En el corazón, estas células pueden ser vistas separando el tronco arterioso (izquierda) en arteria pulmonar y aorta (derecha). (**A**, según Kirby y Waldo 1990; **B**, de Waldo y col. 1998, fotografías cortesía de K. Waldo y M. L. Kirby.)

patías congénitas en humanos y ratones se presentan con defectos en las glándulas paratiroides, tiroidesy el timo. No sería sorprendente si todos estos problemas estuviesen relacionados con defectos en la migración de las células desde la cresta neural.

> SITIO WEB 13.7 **Comunicación entre células de la cresta neural en migración (Communication between migrating neural crest cells).** Investigaciones recientes han demostrado que las células de la cresta neural podrían cooperar entre sí a medida que migran. Es posible que haya una comunicación sutil entre estas células a través de sus complejos de uniones nexo y esta comunicación puede ser importante para el desarrollo cardíaco.

ESPECIFICACIÓN NEURONAL Y ESPECIFICIDAD AXONAL

No solo las células precursoras neuronales y las de la cresta neural migran hacia sus lugares de función, sino que también lo hacen los axones que se extienden desde los cuerpos celulares de las neuronas. A diferencia de la mayoría de las células, en las que todas sus partes se encuentran en el mismo lugar, la neurona es capaz de producir axones que pueden extenderse por metros. Como se vio en el capítulo 12, el axón tiene su propio aparato locomotor, que se localiza en el cono de crecimiento. Este cono ha sido denominado "una célula de la cresta neural en una correa" debido a que, como las células de la cresta neural, éste migra y detecta el ambiente. Además, puede responder a los mismos tipos de señales que pueden detectar las células en migración. Las señales para la migración axonal, por otra parte, pueden ser incluso más específicas que las utilizadas para guiar a ciertos tipos celulares hacia áreas particulares. Cada una de las 10^{11} neuronas en el cerebro humano tiene el potencial para interactuar específicamente con miles de otras neuronas y una neurona de gran tamaño (como una célula de Purkinje o una neurona motora) pueden recibir aferencias de más de 10^5 neuronas (fig. 13-15; Gershon y col. 1985). La comprensión de la generación de esta complejidad

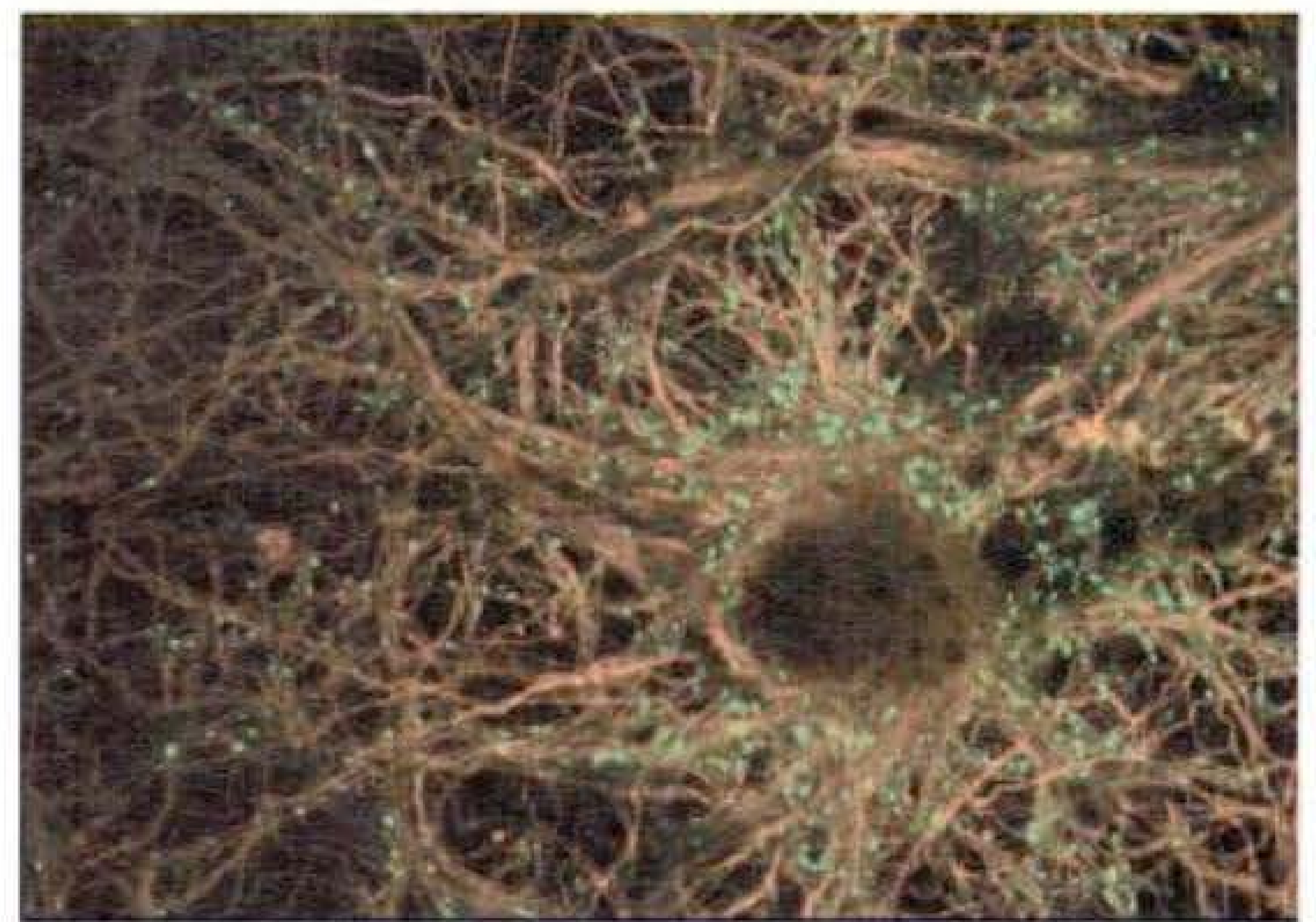


Fig. 13-15. Conexiones de axones en un cultivo de neuronas del hipocampo de la rata. La neurona ha sido teñida de rojo con anticuerpos fluorescentes para tubulina. La neurona parece ser esbozada por la proteína sináptica sinapsina (teñida de verde), que está presente en los terminales de los axones que contactan con ésta. (Microfotografía cortesía de R. Fitzsimmons y PerkinElmer Life Sciences.)

maravillosamente ordenada es uno de los grandes desafíos de la ciencia moderna.

Goodman y Doe (1993) enumeraron ocho estadios de neurogénesis:

1. La inducción y el establecimiento del patrón de una región formadora de neuronas (neurogénica)
2. El nacimiento y migración de neuronas y glía
3. La especificación de los destinos celulares
4. La orientación de los conos de crecimiento axonal hacia sus blancos específicos
5. La formación de las conexiones sinápticas
6. La unión de los factores tróficos para la supervivencia y diferenciación
7. La reorganización competitiva de las sinapsis funcionales
8. Plasticidad sináptica ininterrumpida durante la vida del organismo

De estos procesos los dos primeros fueron temas de capítulos anteriores. Aquí, se continuará la investigación de los procesos del desarrollo neural.

SITIO WEB 13.8 **La evolución de la neurobiología del desarrollo (The evolution of developmental neurobiology).** Santiago Ramón y Cajal, Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini ayudaron a poner orden en el estudio del desarrollo neural al identificar parte de las preguntas importantes que todavía hoy nos ocupan.

Generación de la diversidad neuronal

Las neuronas son especificadas mediante un modo jerárquico. La primera decisión es si una célula dada deberá llegar a ser una neurona o epidermis. Si la célula deberá ser una neurona, la siguiente decisión es qué tipo de neurona será: si será una neurona motora, una neurona sensorial, una neurona comisural o algún otro tipo. Después de que su destino es determinado, todavía otra decisión le da a la neurona un blanco específico. Para ilustrar este proceso de especificación progresiva, el texto se centrará sobre las neuronas motoras de los vertebrados.

Los vertebrados forman un tubo neural dorsal mediante el bloqueo de la señal de BMP y la especificación del destino neural (como opuesto al glial o epidérmico) es llevada a cabo a través de la vía Notch-Delta (véase cap. 6). La especificación del *tipo* de neurona parece ser controlada por la posición del precursor neuronal dentro del tubo neural y por la fecha de nacimiento. Como se describió en el capítulo 12, las neuronas en el margen ventrolateral del tubo neural de vertebrado se convierten en neuronas motoras, mientras que las interneuronas son derivadas a partir de células en la región dorsal del tubo. Debido a que los injertos de células de placa del piso o notocorda (que secretan la proteína Sonic hedgehog) hacia las áreas laterales del tubo neural pueden reespecificar a las células dorsolaterales como neuronas motoras, la especificación del tipo de neurona es probablemente un función de la posición relativa de la célula con respecto a la placa del piso. Ericson y colegas (1996) han demostrado que son necesarios dos períodos de señalización de Sonic hedgehog (Shh) para especificar a las neuronas motoras: un período temprano por medio del cual las células del margen ventrolateral son instruidas a convertirse en neuronas ventrales y un período tardío (que incluye la fase S de su última división celular) que instruye a la neurona ventral a convertirse en una neurona motora (en lugar de una interneurona). La primera decisión probablemente es regulada con mayor posibilidad por Shh desde la notocorda, mientras que la segunda con mayor posibilidad es regulada por Shh desde las células de la placa del piso. Sonic hedgehog parece especificar neuronas motoras mediante la inducción de ciertos factores de transcripción a diferentes concentraciones (Ericson y col. 1992; Tanabe y col. 1998; véase fig. 12-13).

La siguiente decisión involucra la especificidad del blanco. Si una célula se convertirá en una neurona y específicamente en una neurona motora, ¿será esta neurona motora la que inerve el muslo, la extremidad anterior o la lengua? La especificación anteroposterior del tubo neural está regulada de manera primaria por los genes Hox del rombencéfalo hacia la médula espinal y por genes específicos de la cabeza (como Otx) en el cerebro. Dentro de una región del cuerpo, la especificidad de la neurona motora es regulada por la edad de la célula cuando hizo su última división. Como se discutió en el capítulo 12, la fecha de nacimiento de una neurona determina en qué capa de la corteza entrará. Cuando las células más jóvenes migran hacia la periferia, ellas deben pasar a través de las neuronas que se diferenciaron más temprano en el desarrollo. Cuando las neuronas motoras más jóvenes migran hacia la región de las neuronas motoras más viejas en la zona intermedia, expresan nuevos factores de transcripción como resultado de una señal de ácido retinoico (u otros retinoides) secretada por las neuronas motoras nacidas más tempranamente (Sockanathan y Jessell 1998). Estos factores de transcripción son codificados por los genes **Lim** y están relacionados de modo estructural con los codificados por los genes Hox.

Como resultado de sus diferentes fechas de nacimiento y patrones de migración, las neuronas motoras forman tres agrupaciones principales. Los cuerpos celulares de las neuronas motoras que proyectan hacia un único músculo están agrupados en una columna longitudinal de la médula espinal denominada "fondo común". Este agrupamiento es llevado a cabo por diferentes cadherinas que llegan a expresarse sobre estas diferentes poblaciones de células (Landmesser 1978; Hollyday 1980; Price y col. 2002). Estos fondos comunes están agrupados en tres columnas más grandes de acuerdo a sus blancos. En el tórax (fig. 13-16, arriba) las neuronas motoras en la columna de Terni (CT) proyectan ventralmente hacia los ganglios simpáticos. Las neuronas motoras en la columna motora lateral (CML) proyectan hacia los músculos. En las áreas del miembro (fig. 13-16, inferior), los axones de la CLM inervan los músculos del miembro, con neuronas laterales que entran en la musculatura dorsal, mientras que las neuronas más mediales inervan la musculatura ventral del miembro (Tosney y col. 1995). Esta organización de neuronas motoras es constante a través de los vertebrados.

Los blancos de interés de estas neuronas motoras son especificados antes de que se extiendan sus axones hacia

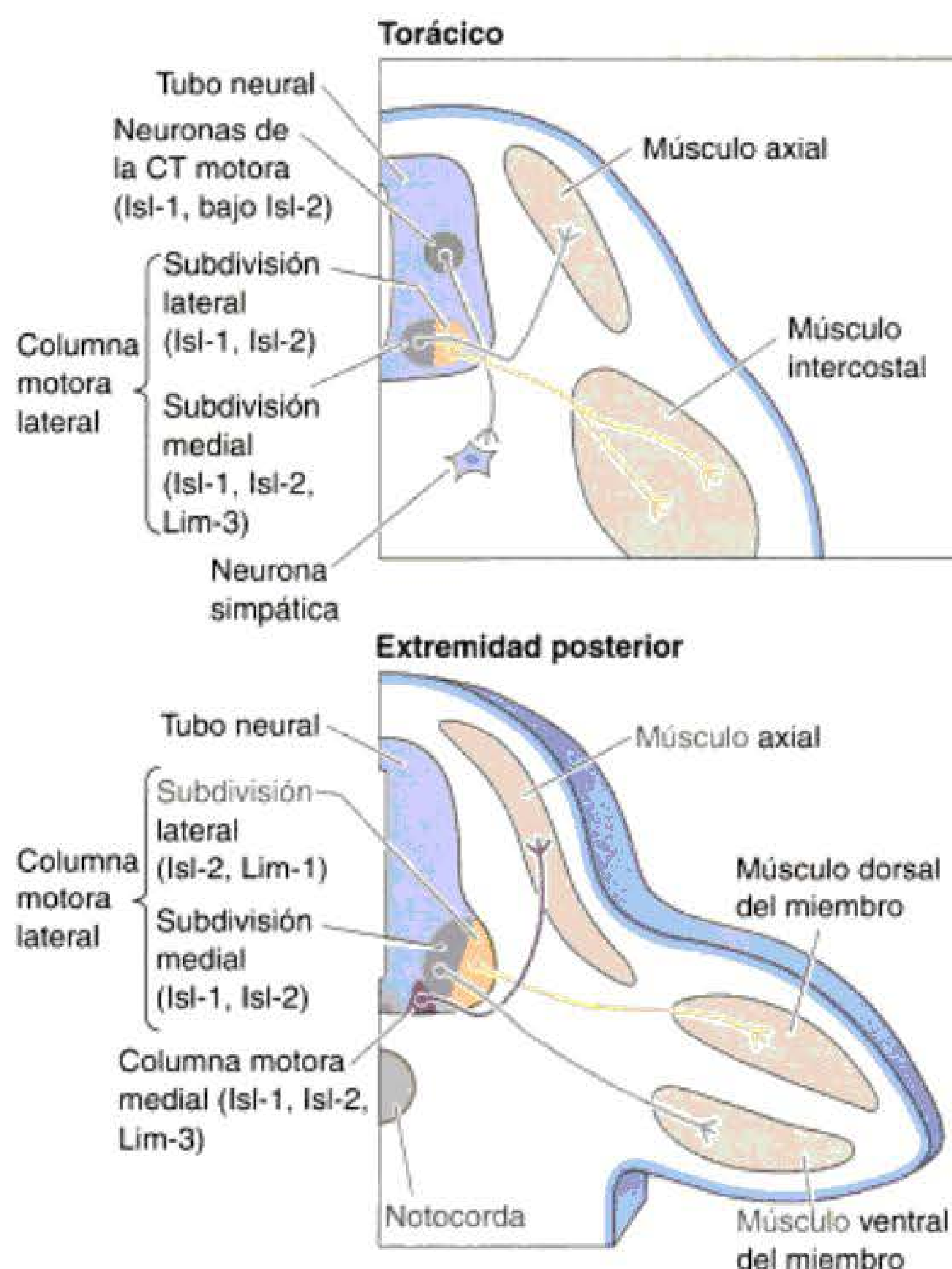


Fig. 13-16. Organización de la neurona motora y especificación de LIM en la médula espinal. Neuronas en diferentes columnas expresan grupos específicos de genes LIM y las neuronas dentro de cada columna toman decisiones exploratorias similares. Las neuronas motoras en la columna de Terni (CT) proyectan ventralmente hacia los ganglios simpáticos. Las neuronas de la columna motora medial proyectan hacia los músculos axiales y las neuronas de la columna motora lateral envían sus axones hacia la musculatura del miembro. Donde estas columnas son subdivididas, las subdivisiones mediales proyectan hacia posiciones ventrales y las subdivisiones laterales envían axones a las regiones dorsales de sus tejidos blanco. (Según Tsushida y col. 1994; Tosney y col. 1995.)

la periferia. Esto fue demostrado por Lance-Jones y Landmesser (1980), quienes invirtieron segmentos de la médula espinal del pollo de modo tal que las neuronas motoras fueron colocadas en nuevas localizaciones. Los axones fueron hacia sus blancos originales, no a los esperados de acuerdo con sus nuevas posiciones (fig. 13-17). Las bases moleculares para la especificidad del blanco residen en los miembros de las proteínas de la familia LIM que son inducidos durante la migración neuronal (véase fig. 13-16; Tsushida y col. 1994; Sharma y col. 2000). Por ejemplo, todas las neuronas motoras expresan Islet-1 y (un poco más tarde) Islet-2. Si no se expresa otra proteína LIM, las neuronas proyectan hacia los músculos de la pared corporal ventral. Sin embargo, si también se sintetiza Lim-3, las neuronas motoras proyectan dorsalmente hacia los músculos axiales. Si a cada uno de los tipos de neurona motora se le hace expresar Lim-3, todas inervarán a los músculos axiales (o al menos intentarán hacerlo; los axones que llegan tarde y encuentran los sitios llenos, proyectarán a blancos alternativos). Por lo tanto, cada grupo de neuronas está caracterizado por una constelación particular de factores de transcripción LIM.

SITIO WEB 13.9 **Tinción con peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase staining).** Muchos de los descubrimientos fundamentales de la especificidad axonal utilizaron una técnica por la cual la enzima de planta peroxidasa de rábano fue inyectada en los nervios.

Formación del patrón en el sistema nervioso

El funcionamiento del cerebro de los vertebrados depende no solo de la diferenciación y posicionamiento de las neuronas, sino también de las conexiones específicas que estas células hacen entre ellas y sus blancos periféricos. De alguna forma, las neuronas de un órgano sensorial, como el ojo, deben conectarse a neuronas específicas en el cerebro que puedan interpretar los estímulos visuales y los axones del sistema nervioso deben cruzar grandes extensiones de tejidos antes de inervar su tejido blanco. ¿De qué manera "sabe" el axón de la neurona cómo atravesar numerosas células blanco potenciales para hacer su conexión específica?

Ross G. Harrison (véase fig. 4-3) primero sugirió que la especificidad del crecimiento axonal es debida a fibras nerviosas pioneras, que van por delante de otros axones y que les sirven de guías* (Harrison 1910). Esta observación simplifica, pero no resuelve, el problema de cómo forman las neuronas los patrones apropiados de interconexiones. Sin embargo, Harrison también advirtió que los axones deben crecer sobre un sustrato sólido y especuló que las diferencias entre superficies embrionarias podrían permitir a los axones viajar en ciertas direcciones especificadas. Las conexiones finales tendrían lugar mediante interacciones complementarias sobre la superficie de la célula blanco.

> *Que tiene que haber alguna clase de reacción de superficie entre cada tipo de fibra nerviosa y la estructura particular a ser inervada parece claro del hecho de que las fibras sensoriales y motoras, aunque corren muy juntas en el mismo haz, sin embargo, forman conexiones periféricas adecuadas, unas con la epidermis y las otras con el músculo... Los hechos precedentes sugieren que puede haber una cierta analogía en este caso con la unión del gameto femenino y el espermatozoide.*

* Los conos de crecimiento de las neuronas pioneras migran hacia su tejido blanco mientras las distancias embrionarias todavía son cortas y el tejido embrionario interpuesto todavía es relativamente poco complicado. Más tarde en el desarrollo, otras neuronas se unen a las neuronas pioneras y de este modo ingresan al tejido blanco. Klose y Bentley (1989) han demostrado que en algunos casos, las neuronas pioneras mueren después que otras neuronas alcanzan sus destinos. Aun si se evita la diferenciación de las neuronas pioneras, los otros axones no alcanzan su tejido blanco.

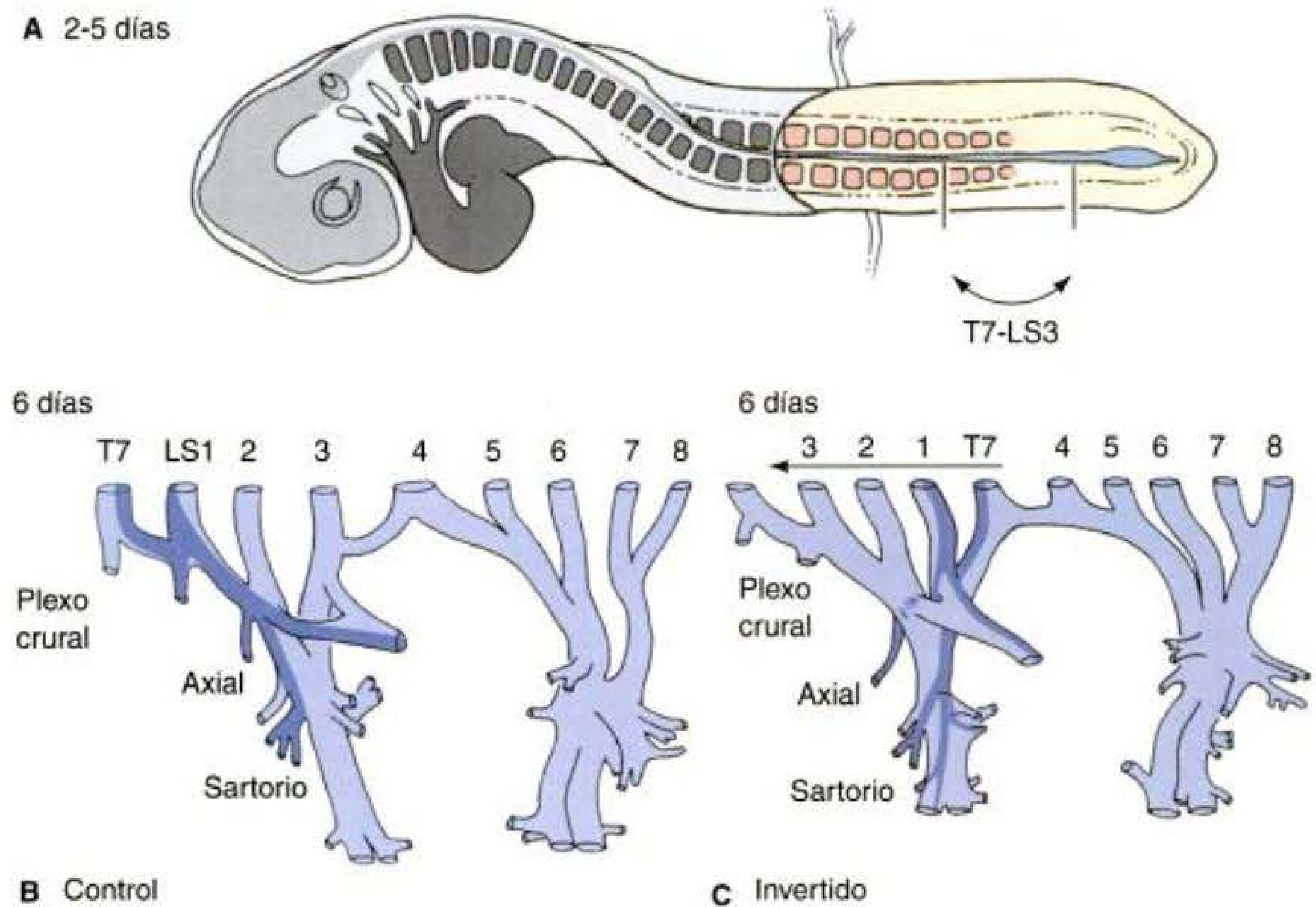


Fig. 13-17. Compensación de dislocaciones pequeñas de la posición de inicio axonal en el embrión de pollo. **A.** Una porción de médula espinal que comprende los segmentos T7-LS3 (segmentos séptimo torácico a tercero lumbosacro) es invertida en el día embrionario 2,5. **B.** Patrón normal de proyección axonal hacia los músculos en el día 6. **C.** Proyección de los axones desde el segmento invertido. Las neuronas situadas ectópicamente encuentran finalmente su camino neuronal apropiado e inervan los músculos apropiados. (De Lance-Jones y Landmesser 1980.)

La investigación sobre la especificidad de las conexiones neuronales se ha centrado sobre dos sistemas principales: las neuronas motoras, cuyos axones viajan desde la médula espinal hacia un músculo específico y el sistema óptico, por medio del cual los axones originados en la retina encuentran su camino hacia el cerebro. En ambos casos, la especificidad de las conexiones axonales se ve que se produce en tres etapas (Goodman y Shatz 1993):

1. **Selección del camino**, por medio del cual los axones viajan a lo largo de una ruta que los conduce a una región particular del embrión
2. **Selección del blanco**, por medio del cual los axones, una vez que alcanzaron el área correcta, reconocen y se unen a un grupo de células con las cuales formarán conexiones estables
3. **Selección de la dirección**, por medio de la cual son refinados los patrones iniciales, de modo tal que los axones se unen a un pequeño subgrupo (a veces solo uno) de sus blancos posibles.

Los dos primeros procesos son independientes de la actividad neuronal. El tercer proceso involucra interacciones entre varias neuronas activas y transforma las proyecciones superpuestas en un patrón de conexiones puesto a punto.

Se sabe desde la década de 1930 que los axones de las neuronas motoras pueden encontrar su músculos apropiados incluso si se bloquea la actividad neural de los axones. Twitty (quien había sido estudiante de Harrison) y sus colegas hallaron que los embriones de tritón de *Taricha torosa* secretaban una toxina, tetrodotoxina, que bloqueaba la transmisión neural en otras especies. Mediante el injerto de trozos de embriones de *T. torosa* en embriones de otras especies de salamandra, pudieron paralizar a los embriones huéspedes por varios días mientras se producía el desarrollo. Se hicieron las conexiones neuronales normales, aunque no se podía producir ninguna actividad neuronal. Cerca del momento en el que los renacuajos estaban listos para alimentarse, la toxina se quitó y las salamandras jóvenes nadaban y se alimentaban normalmente (Twitty y Johnson 1934; Twitty 1937). Experimentos más recientes, que utilizaron mutantes de pez cebra con receptores de neurotransmisores no funcionales, demostraron de modo semejante que las neuronas motoras pueden establecer sus patrones normales de inervación ante la ausencia de la actividad neuronal (Westerfield y col. 1990).

Pero la pregunta continuá: ¿cómo son instruidos los axones adónde ir?

Adhesión celular y guía del contacto mediante moléculas atractivas y permisivas

El camino inicial que sigue un cono de crecimiento axonal está determinado por el ambiente con el que este cono se encuentra. El ambiente extracelular puede proporcionar sustratos sobre los cuales migrar y estos sustratos pueden proporcionar información de navegación para el cono axonal. Algunos de los sustratos que encuentra el cono de crecimiento le permitirán adherirse a éstos y por lo tanto promover la migración axonal. Otros sustratos harán que el cono de crecimiento se retraiga y no le permitirán a su axón crecer en esa dirección. Algunos de estos sustratos pueden dar señales extremadamente específicas, reconocidas solo por un pequeño grupo de conos de crecimiento neuronales, mientras que otras señales son reconocidas por grandes grupos de neuronas. Las señales migratorias de sustrato pueden venir desde estructuras anatómicas, la matriz extracelular o desde superficies celulares adyacentes.

Las señales de la matriz extracelular, con frecuencia, ofrecen los sustratos de adhesión preferidos para la migración. Los conos de crecimiento prefieren migrar sobre las superficies que son más adhesivas que sus alrededo-

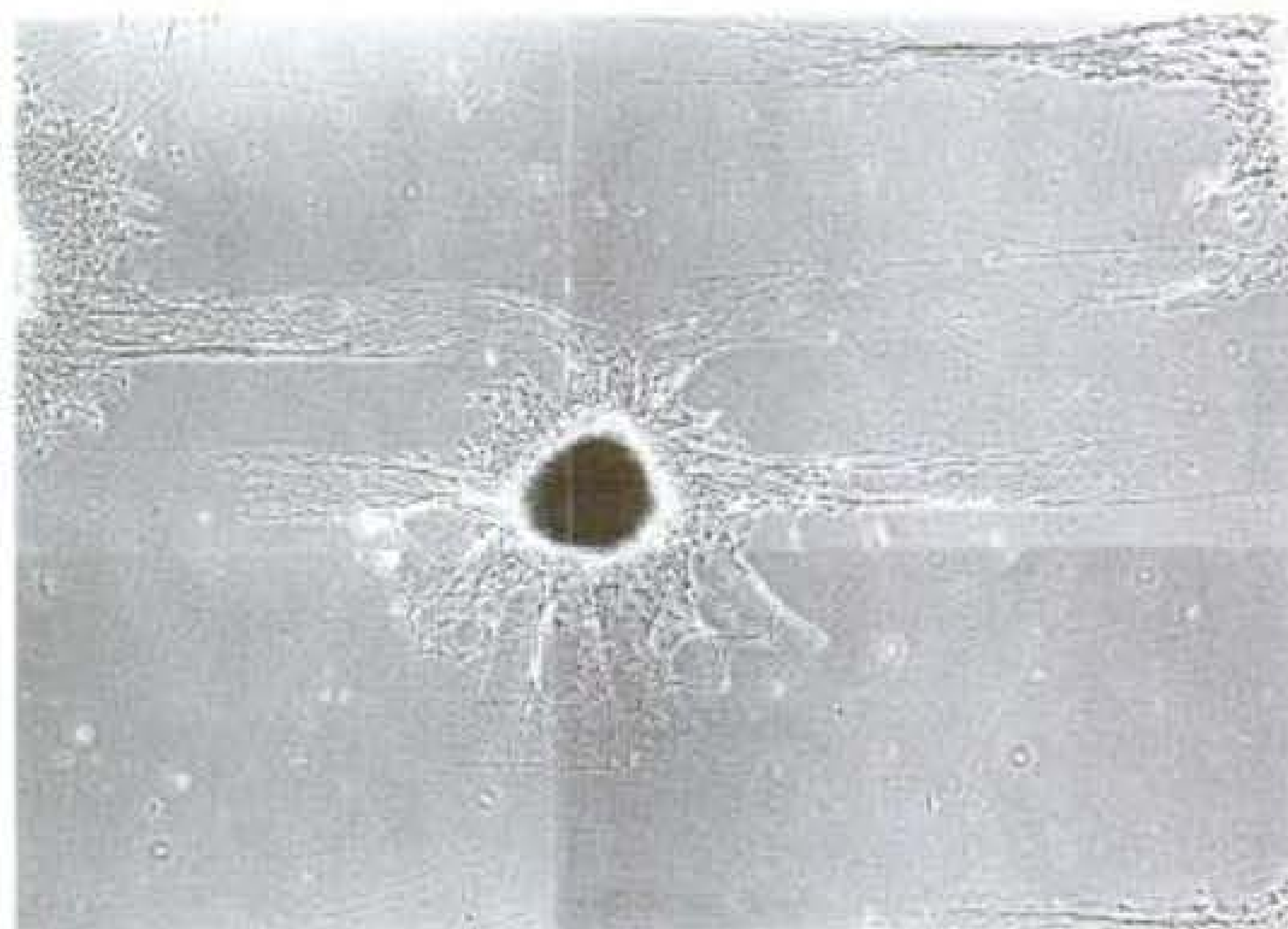


Fig. 13-18. Extensión de las neuronas sensoriales colocadas sobre un sustrato con un patrón que consiste en tiras paralelas de laminina aplicadas en un fondo de colágeno tipo IV. (De Gundersen 1987; microfotografía cortesía de R. W. Gundersen.)

res y un sendero de moléculas adhesivas puede dirigirlos hacia sus blancos. La presencia de moléculas de la matriz extracelular adhesivas define caminos microscópicos a través del embrión sobre los cuales viajan los axones (Akers y col. 1981; Gundersen 1987). Muchos de estos caminos parecen ser pavimentados con la glucoproteína **laminina** (fig. 13-18). Letourneau y col. (1988) demostraron que los axones de ciertas neuronas espinales viajan a través del neuroepitelio sobre una superficie transitoriamente cubierta de laminina que marca su sendero con precisión. Asimismo, hay una muy buena coordinación entre la elongación de los axones de la retina y la presencia de laminina sobre las células neuroepiteliales y gliales en el cerebro embrionario de ratón (Cohen y col. 1987; Liesi y Silver 1988). Se ven depósitos de laminina puntuales sobre la superficie de las células gliales a lo largo de los caminos que conducen desde las células ganglionares de la retina hacia el tectum óptico en el cerebro, mientras que áreas adyacentes (donde falla el crecimiento de los axones de la retina) carecen de estos depósitos de laminina. Después de que los axones de la retina han alcanzado el tectum, las células gliales se diferencian y pierden su laminina. En este punto, las neuronas ganglionares de la retina, que han formado el nervio óptico, pierden sus receptores de integrina para laminina.

Guía por repulsión específica del cono de crecimiento

Además de la adhesión específica, existe también la posibilidad de repulsión específica por sustratos extracelulares. Así como las células de la cresta neural son inhibidas a migrar a través de la porción posterior de un esclerotoma, los axones desde el ganglio de la raíz dorsal y las neuronas motoras pasan solamente a través de la porción anterior de cada esclerotoma y evitan migrar a través de la porción posterior (fig. 13-19; además véase fig. 13-5). Davies y col. (1990) demostraron que las membranas aisladas desde la porción posterior de un somita causan el colapso de los conos de crecimiento de estas neuronas (fig. 13-19B, C). Estudios recientes (Wang y Anderson 1997; Krull y col. 1999) han demostrado que estos conos de crecimiento contienen receptores Eph que responden a las proteínas efrinas de las células del esclerotoma posterior. Por lo tanto, las mismas señales que establecen el patrón de migración celular de la cresta neural también establecen el patrón de extensión axonal neuronal espinal.

Además de las efrinas, las **proteínas semaforinas** también guían los conos de crecimiento por repulsión selectiva. Estas proteínas de membrana son vistas en todo el reino animal y son responsables del direccionamiento de muchos axones hacia sus blancos. Ellas son especialmente importantes en la producción de "giros" cuando un axón no crece en línea recta, sino que debe cambiar de dirección. La semaforina 1 es una proteína de transmembrana que es expresada en una banda de células epiteliales en la extremidad del insecto en desarrollo. Esta proteína parece inhibir el movimiento hacia adelante del cono de crecimiento de las neuronas sensoriales Ti1, haciendo que éstos giren (fig. 13-20; Kolodkin y col. 1992, 1993). En *Drosophila*, la semaforina 2 es secretada por

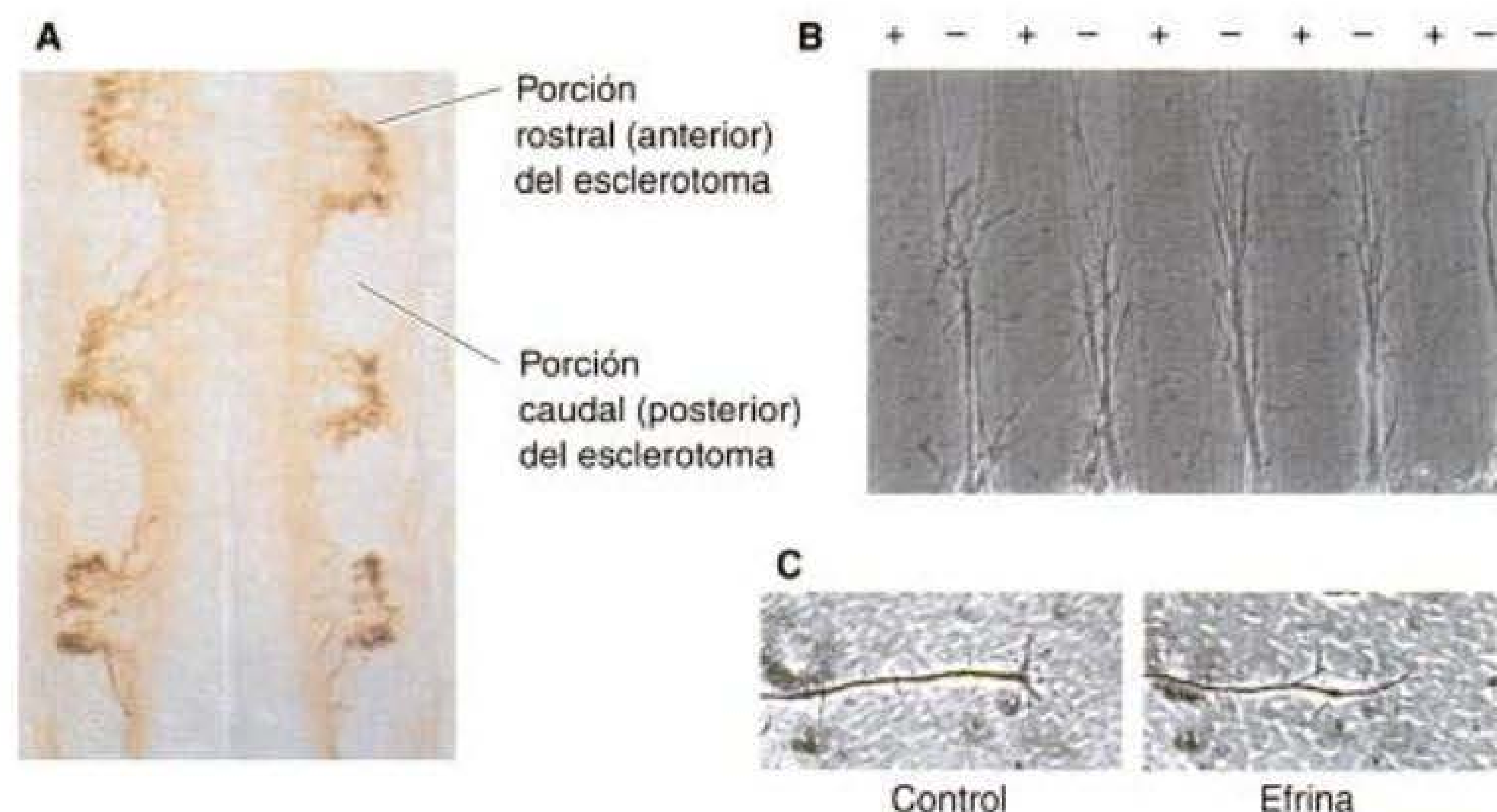


Fig. 13-19. Repulsión de los conos de crecimiento del ganglio de la raíz dorsal. **A.** Axones motores que migran a través del compartimento rostral (anterior), pero no del caudal (posterior), de cada esclerotoma. **B.** Ensayo in vitro por medio del cual fueron colocadas tiras de efrina sobre una superficie de fondo de laminina. Los axones motores crecieron solamente donde la efrina estaba ausente. **C.** Inhibición de los conos de crecimiento por efrina después de 10 minutos de incubación. La fotografía de la izquierda muestra un axón control sujeto a un componente similar (pero no inhibitorio); el axón de la derecha fue expuesto a una efrina encontrada en el esclerotoma posterior. (De Wang y Anderson 1997; microfotografías cortesía de los autores.)

un único músculo torácico grande. De este modo, el músculo torácico evita que el mismo sea inervado por axones inapropiados (Matthes y col. 1995). La semaforina 3, hallada en aves y mamíferos, también es conocida como colapsina (Luo y col. 1993). Se encontró que esta proteína secretada colapsa el cono de crecimiento de axones originados en los ganglios de la raíz dorsal. Hay varios tipos de neuronas en los ganglios de la raíz dorsal cuyos axones ingresan a la médula espinal dorsal. A la mayoría de estos axones se les impide viajar lejos y entrar a la médula espinal ventral. Sin embargo, un subgrupo de estos axones viaja ventralmente a través de otras células neurales (fig. 13-21). Estos axones particulares no son inhibidos por semaforina 3, mientras que sí lo son los de otras neuronas (Messersmith y col. 1995). Este hallazgo sugiere que semaforina/colapsina establecen el patrón de proyecciones sensoriales desde los ganglios de la raíz dorsal por la repulsión selectiva de ciertos axones, de modo tal que ellos terminan dorsalmente. Un esquema semejante es utilizado en el cerebro, por medio del cual la semaforina producida en una parte del cerebro es utilizada para evitar la entrada de neuronas que vienen desde otra región del cerebro (Marín y col. 2001).

Como cualquier psicólogo sabe, con frecuencia, hay una delgada línea entre la repulsión y la atracción. En la base de ambos fenómenos hay algún tipo de reconocimiento de evento. Esto también sucede con las neuronas.

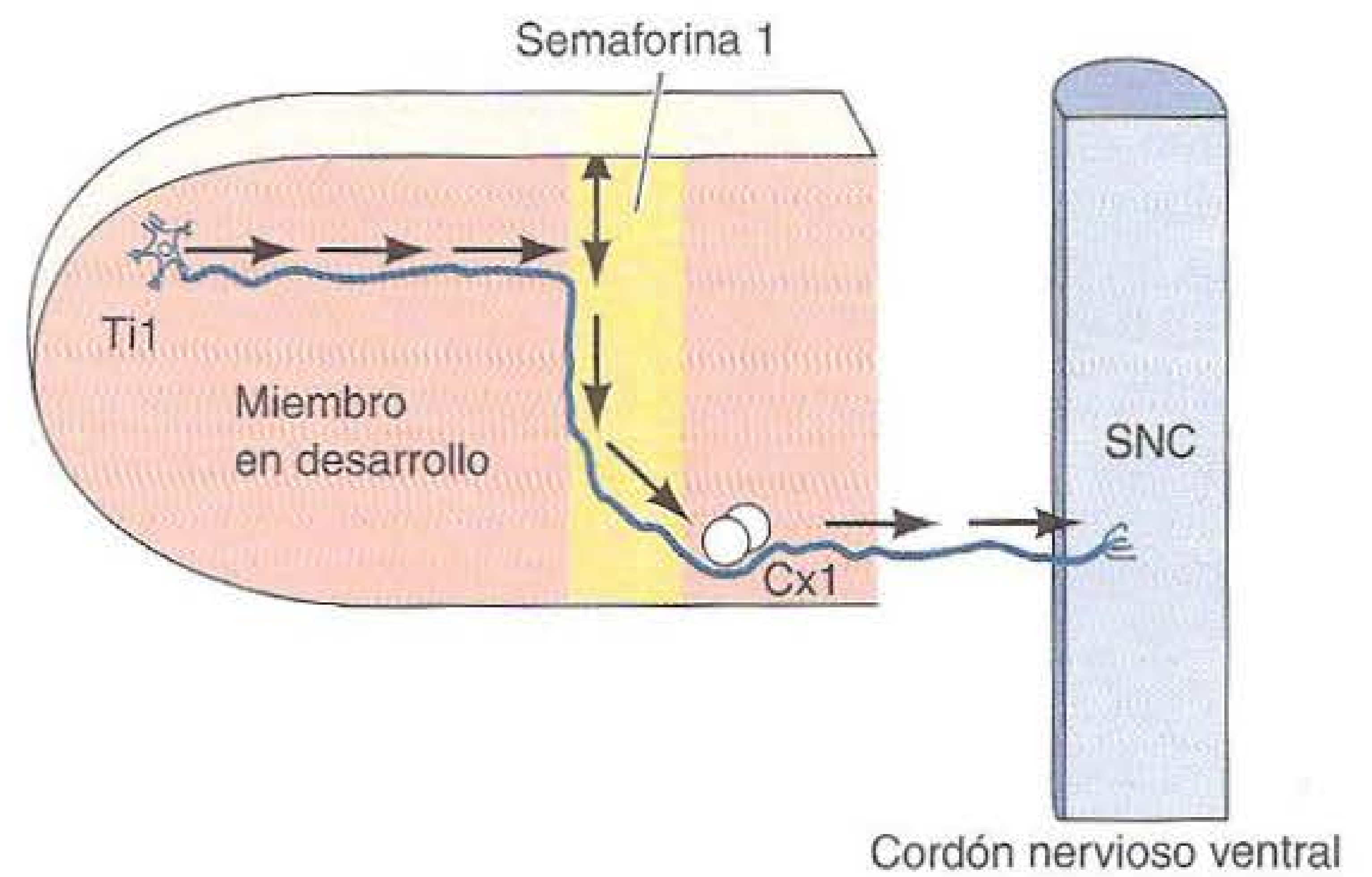


Fig. 13-20. Acción de la semaforina 1 en el desarrollo del miembro del saltamonte. El axón de la neurona sensorial Ti1 proyecta hacia el sistema nervioso central. (Las flechas oscuras representan etapas secuenciales en el camino.) Cuando éste alcanza una banda de células epiteliales que expresan semaforina 1, reorienta su cono de crecimiento y se extiende ventralmente a lo largo del límite distal de las células que están expresando semaforina 1. Cuando estos filopodios conectan al par de células Cx1, cruzan el límite y proyectan hacia el SNC. Cuando la semaforina 1 es bloqueada por anticuerpos, el cono de crecimiento busca al azar a las células Cx1. (Según Kolodkin y col. 1993.)

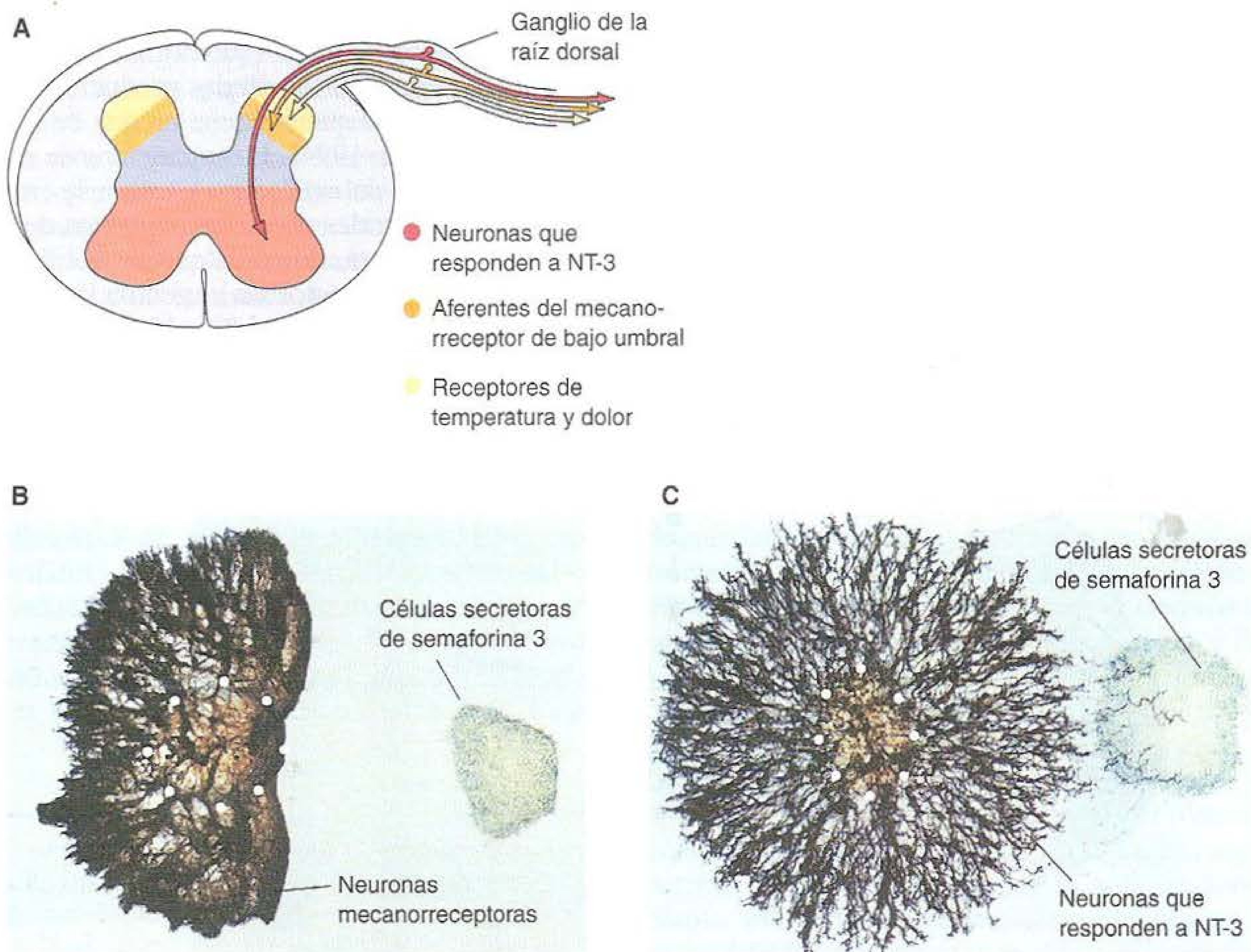


Fig. 13-21. Semaforina 3 como un inhibidor selectivo de las proyecciones axonales hacia la médula espinal ventral. **A.** Trayectoria de los axones con relación a la expresión de semaforina 3 en la médula espinal de una rata embrionaria de 14 días. Las neuronas sensibles a neurotrofina 3 pueden viajar hacia la región ventral de la médula espinal, pero los axones aferentes de los mecanorreceptores y de las neuronas receptoras de temperatura y dolor terminan dorsalmente. **B.** Las células fibroblásticas de pollo transgénicas que secretan semaforina 3 inhiben la extensión de los axones mecanorreceptores. Estos axones están creciendo en medio tratado con NGF, que estimula su crecimiento, pero todavía están siendo inhibidos para crecer hacia la fuente de semaforina 3. **C.** Las neuronas sensibles a NT-3 para crecer no son inhibidas a extenderse hacia la fuente de semaforina 3 cuando crecen con NT3. (A, según Marx 1995; B y C, de Messersmith y col. 1995, fotografías cortesía de A. Kolodkin.)

Cuando el receptor de la proteína efrina A7 reconoce a la efrina A5 en el tubo neural del ratón, el resultado es la atracción en lugar de la repulsión. La interacción entre estas dos proteínas es crítica para el cierre del tubo neural. Las proteínas EphA7 y EphA5 causan la *adhesión* de las células de la placa neural y la supresión de cualquiera de ellas da como resultado una condición similar a la anencefalia. El cambio de la repulsión a la adhesión es causado por un procesamiento alternativo del RNA. Mediante el uso de un sitio de empalme diferente, la placa neural de ratón produce EphA7 que carece del dominio de tirosina cinasa que transmite la señal repulsiva (Holmberg y col. 2000). Como resultado, las células se reconocen entre sí a través de estas proteínas y no se produce repulsión. De un modo diferente, las semaforinas pueden ser también quimioatractantes. La semaforina 3A es un quimiorrepelente clásico para los axones que vienen de las neuronas piramidales en la corteza de mamíferos. Sin embargo, es quimioatractante para las *dendritas* de estas mismas células. De este modo, un blanco puede "extenderse" a las dendritas de estas células sin además atraer a sus axones (Polleux y col. 2000).

SITIO WEB 13.10 **Los caminos de las neuronas motoras (The pathways of motor neurons).** Para inervar la musculatura del miembro, un axón motor se extiende sobre cientos de células en un ambiente complejo y cambiante. Investigaciones recientes han descubierto varios caminos y barreras que ayudan a guiar a estos axones hacia sus destinos apropiados.

Guía mediante moléculas difusibles

NETRINAS Y SUS RECEPTORES. La idea de que las señales quimiotácticas guían a los axones en el sistema nervioso en desarrollo fue propuesta por primera vez por Santiago Ramón y Cajal (1892). Él sugirió que a las neuronas comisurales de la médula espinal quizás se les dijera por factores difusibles que enviaran axones desde sus posiciones dorsales hacia la placa del piso ventral. Las neuronas comisurales son interneuronas que cruzan la línea media ventral para coordinar las actividades motoras derecha e izquierda. Por lo tanto, ellas de algún modo deben migrar hacia (y a través) la línea media ventral. Los axones de estas neuronas comienzan a crecer ventralmente hacia abajo junto al tubo neural. Sin embargo, en cerca de dos tercios del camino hacia abajo, su dirección cambia y ellas proyectan a través del área neuronal ventrolateral (motora) del tubo neural hacia las células de la placa del piso (fig. 13-22).

En 1994, Serafini y col. desarrollaron un ensayo experimental que les permitió estudiar una molécula difusible que podría estar guiando a las neuronas comisurales. Cuando explantos de médula espinal dorsal desde embriones de pollo fueron colocados sobre geles de colágeno, la presencia de células de la placa del piso cerca de ellos estimuló la extensión de los axones comisurales. Serafini y col. tomaron fracciones de homogenato del cerebro embrionario del pollo y las analizaron para ver si cualquiera de estas proteínas que estaban allí imitaba esta actividad. El proceso dio como resultado la identificación de dos proteínas, **netrina-1** y **netrina-2**. La netrina-1 es producida y secretada por las células de la placa del piso, mientras que la netrina-2 es sintetizada en la región más inferior de la médula espinal, pero no en la placa del piso (fig. 13-22B). Los efectos quimitácticos de estas netrinas fueron demostrados por la transformación de células de fibroblasto de pollo (que normalmente no producen estas proteínas) hacia células productoras de netrina utilizando un vector que contiene un gen de netrina activo (Kennedy y col. 1994). Los agregados de estos fibroblastos secretores de netrina provocaron la extensión de los axones comisurales desde los explantos de la médula espinal dorsal de rata, mientras que las células control a las que se les dio el vector sin el gen de la netrina activo no provocaban esta actividad (fig. 13-23). Es posible que las neuronas comisurales encuentren primero un gradiente de netrina-2, que las atrae hacia el dominio de un gradiente brusco de netrina-1 (véase fig. 13-22A).

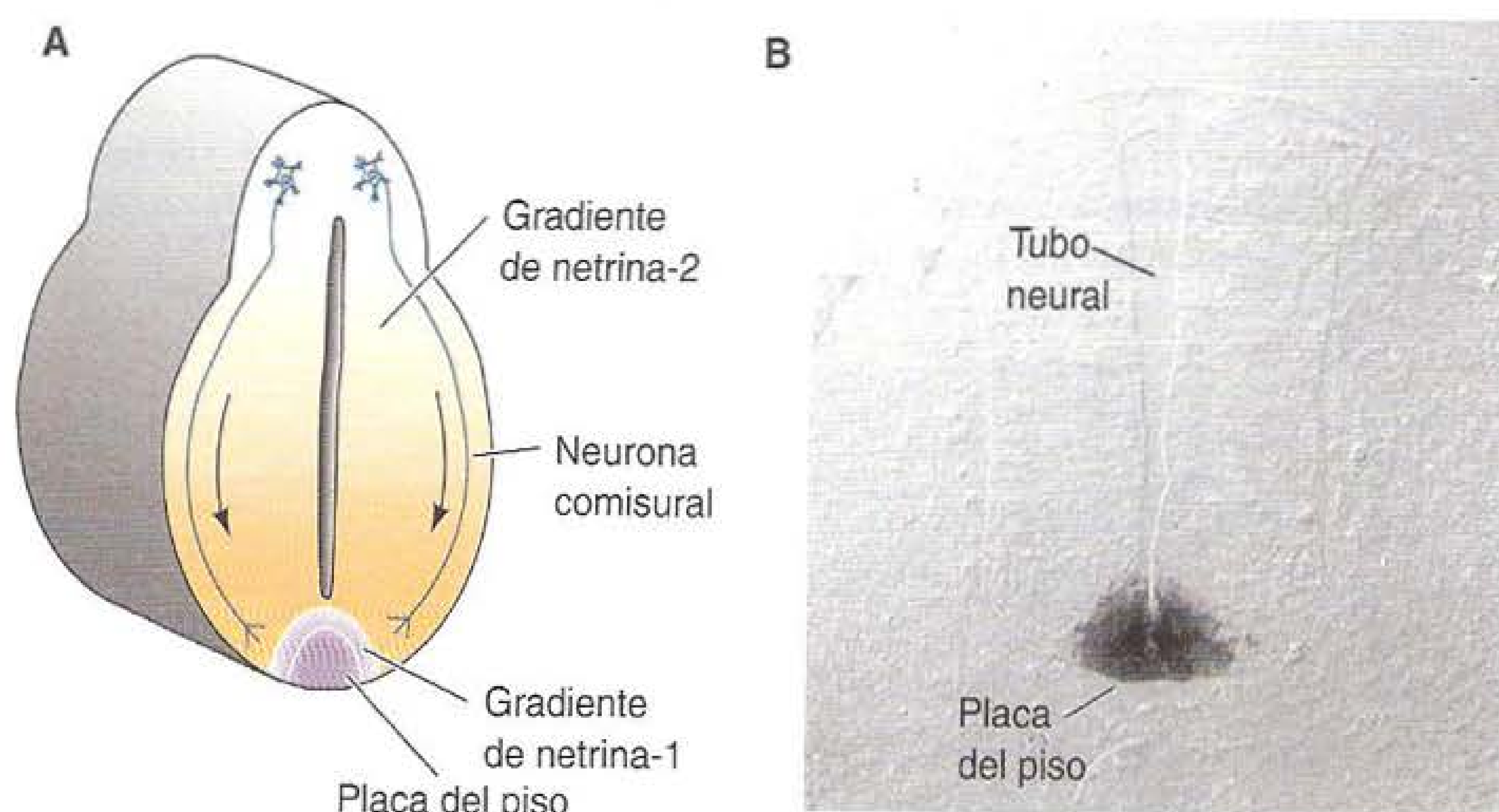


Fig. 13-22. Trayectoria de los axones comisurales en la médula espinal de la rata. **A.** Dibujo esquemático de un modelo por el cual las neuronas comisurales primero experimentan un gradiente de netrina-2 y luego un gradiente brusco de netrina-1. Los axones comisurales son por lo tanto guiados quimiotácticamente en modo ventral bajo el margen lateral de la médula espinal hacia la placa del piso. Cuando alcanzan la placa del piso, cambian su dirección debido a su contacto orientador con las células de la placa del piso. **B.** Localización autorradiográfica del mRNA de netrina-1 mediante hibridación in situ de un antisentido de RNA para la médula espinal de un embrión de rata joven. El mRNA de netrina-1 (área oscura) está concentrado en las neuronas de la placa del piso. (B, de Kennedy y col. 1994; microfotografía cortesía de M. Tessier-Lavigne.)

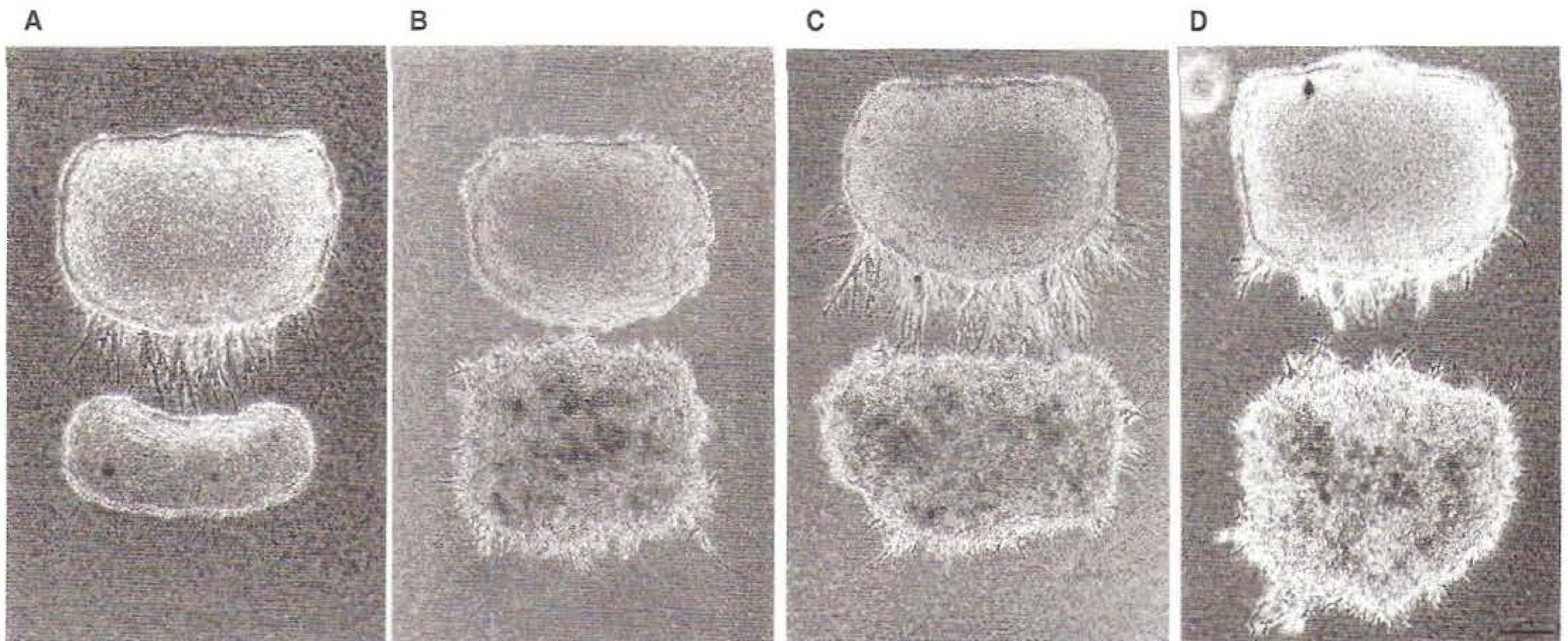


Fig. 13-23. Células de fibroblasto de pollo transformadas (COS) que secretan netrinas provocan la extensión del axón de las neuronas comisurales de explantos de médula espinal dorsal de un embrión de rata de 11 días. **A.** La extensión de los axones comisurales es vista cuando un explanto de la médula espinal dorsal (tejido superior) se encuentra con un explanto de la placa del piso. **B.** No se observa extensión cuando un explanto de la médula espinal es expuesto a un agregado de células de fibroblasto de pollo que han sido transfectadas solamente con el vector de clonación (sin el gen de la netrina). **C, D.** Extensión del axón comisural en respuesta al agregado de células fibroblásticas de pollo que expresan el gen para C, netrina-1 y D, netrina-2. La identidad de las extensiones fue confirmada por inmunohistología, que demostró antígenos específicos comisurales sobre los axones. Barra de escala, 100 μm. (De Kennedy y col. 1994; microfotografías cortesía de M. Tessier-Lavigne.)

En estos experimentos, ambas netrinas llegan a estar asociadas con la matriz extracelular.* Esta asociación puede jugar importantes papeles. En vertebrados, netrina-1 sirve como una señal de repulsión y de atracción. Los conos de crecimiento de las neuronas de la retina de *Xenopus*, por ejemplo, son atraídos hacia la netrina-1 y son guiados hacia la cabeza del nervio óptico por estos factores difusibles. Sin embargo, una vez allí la combinación de netrina-1 y de laminina evita que los axones se desvíen del nervio óptico. Parece que la laminina de la matriz extracelular que rodea al nervio óptico transforma a la netrina de ser una molécula atractiva a ser una molécula repulsiva (Höpker y col. 1999).

Las netrinas tienen numerosas regiones de homología con UNC-6, una proteína implicada en dirigir la migración circunferencial de los axones alrededor del cuerpo de *Caenorhabditis elegans*. En los nematodos tipo salvaje, UNC-6 induce a los axones de ciertas neuronas sensoriales localizadas centralmente a moverse en sentido ventral y esto induce a algunas neuronas motoras localizadas ventralmente a extender sus axones en sentido dorsal (fig. 13-24). En las mutaciones de pérdida de función de *unc-6*, no se produce ninguno de estos movimientos axonales (Hedgecock y col. 1990; Ishii y col. 1992; Hamelin y col. 1993). Las mutaciones del gen *unc-40* alteran la migración axonal ventral (pero no la dorsal), mientras que las mutaciones del gen *unc-5* evitan solamente la migración dorsal. La evidencia genética y bioquímica sugiere que UNC-5 y UNC-40 son porciones del complejo del receptor de UNC-6 y que UNC-5 puede transformar una atracción (mediada únicamente por UNC-40) en una repulsión (Leonardo y col. 1997; Hong y col. 1999).

Si UNC-6 tiene función de atracción para algunas neuronas y de repulsión para otras, se podría esperar que este doble papel también pudiera ser atribuido a las netrinas. Colamarino y Tessier-Lavigne (1995) han demostrado que éste es el caso al analizar la trayectoria del nervio troclear (cuarto nervio craneal). En su camino para inervar al músculo del ojo, los axones del nervio troclear se originan cerca de la placa del piso del tronco del cerebro y migran dorsalmente alejándose de la región de la placa del piso. Esta ruta es mantenida cuando la región del tronco del cerebro es explantada en un gel de colágeno. La extensión dorsal de las neuronas trocleares puede evitarse por la colocación de células de la placa del piso o células fibroblásticas de pollo transgénicas secretoras de netrina-1 dentro de 450 μm de la porción dorsal del explanto. Esta extensión dorsal no es evitada por el explanto dorsal del tubo neural o por las células de fibroblastos de pollo que no contienen al gen netrina-1 activo (fig. 13-25). Por esta razón, las netrinas y UNC-6 parecen ser quimiotácticas para algunas neuronas y quimiorrepulsivas para otras.

Hay alguna reciprocidad en ciencia y así como la investigación sobre los genes de netrina de vertebrados condujeron al descubrimiento de sus homólogos de *C. elegans*, la investigación sobre el gen *unc-5* del nema-

* La unión de un factor soluble a la matriz extracelular contribuye a una interesante ambigüedad entre quimiotaxis y migración sobre sustratos preferidos (haptotaxis). La naturaleza no se conforma necesariamente con las categorías que creamos. También hay alguna confusión entre los términos *neurotrópico* y *neurotrófico*. Neuro*trópico* (latín, *tropicus*, un movimiento de giro) significa que algo atrae a la neurona. Neuro*trófico* (griego, *trophikos*, atención o cuidado) se refiere a la capacidad de un factor para mantener viva a la neurona, por lo general, mediante el suministro de factores de crecimiento. Debido a que muchos agentes tienen ambas propiedades, son denominados alternativamente "neurotropinas" y "neurotrofinas." En la literatura reciente, "neurotrofina" parece ser utilizado más ampliamente.

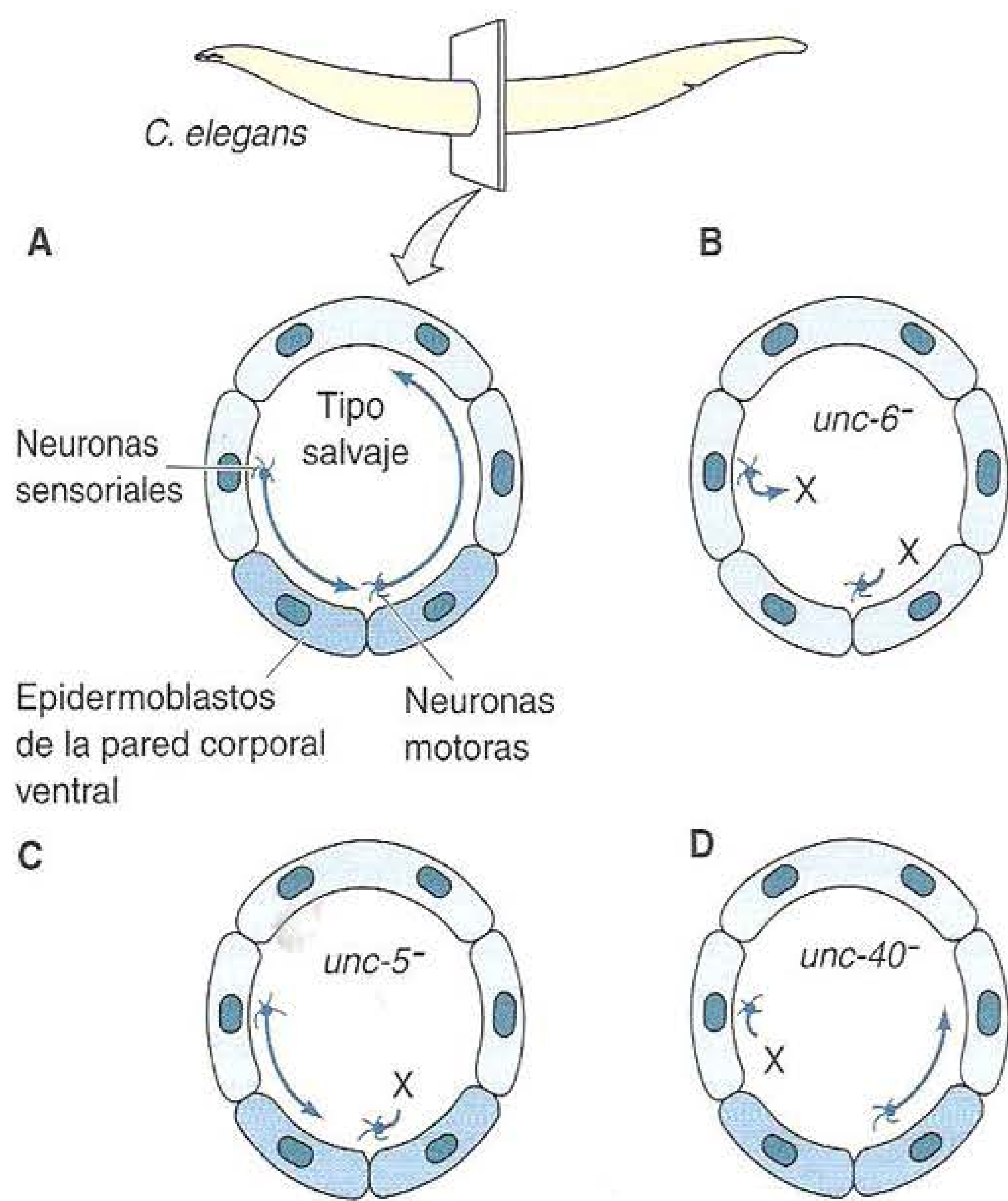


Fig. 13-24. Expresión de UNC y función en la guía axonal. **A.** En el cuerpo de un embrión de *C. elegans* tipo salvaje, las neuronas sensoriales proyectan de manera ventral y las neuronas motoras proyectan de manera dorsal. Los epidermoblastos de la pared ventral del cuerpo que expresan UNC-6 están sombreados de oscuro. **B.** En el embrión mutante *unc-6*, no se produce ninguna de estas migraciones. **C.** La mutación de pérdida de función de *unc-5* afecta solamente a los movimientos dorsales de las neuronas motoras. **D.** Las mutaciones de pérdida de función de *unc-40* afectan solamente la migración ventral de los conos de crecimiento sensorial. (Según Goodman 1994.)

todo llevó al descubrimiento del gen humano que codifica el receptor de netrina. Éste parece ser un gen cuyas mutaciones en ratones causan una enfermedad denominada malformación cerebelosa rostral (Ackerman y col. 1997; Leonardo y col. 1997).

SITIO WEB 13.11 **Control genético de la migración de los neuroblastos en *C. elegans* (Genetic control of neuroblast migration in *C. elegans*).** El gen homeótico *mab-5* controla la dirección en la que ciertas neuronas migran en el nematodo. La expresión de este gen puede alterar el camino por el que viaja una neurona.

PROTEÍNAS SLIT. Las proteínas difusibles, además, pueden proporcionar una guía u orientación mediante repulsión. Una importante molécula quimiorrepulsiva es la proteína **Slit**. En *Drosophila*, la proteína Slit es secretada por las células de la cresta neural en la línea media y actúa para evitar que la mayoría de las neuronas crucen la línea media de un lado al otro. Los conos de crecimiento de las neuronas de *Drosophila* expresan la proteína **Roundabout** (rotonda o glorieta) (**Robo**), que es el receptor para la proteína Slit. De este modo, se evita que la mayoría de las neuronas de *Drosophila* migren a través de la línea media. Sin embargo, las neuronas comisurales que atraviesan al embrión de un lado al otro encuentran un camino para evitar esta repulsión. Ellas llevan a cabo esta tarea al regular en menos la proteína Robo cuando se aproximan a la línea media. Una vez que han viajado a través de la línea media del embrión, ellas vuelven a expresar esta proteína y se vuelven nuevamente sensibles a las acciones inhibitorias de Slit en la línea media (fig. 13-26; Brose y col. 1999; Kidd y col. 1999).

Slit también funciona en el sistema nervioso de vertebrados para orientar a los conos de crecimiento neuronales. Hay tres proteínas Slit en vertebrados y ellas son utilizadas para apartar a las neuronas motoras y a las neuronas olfatorias (olfato) (Brose y col. 1999; Li y col. 1999). Esta actividad repulsiva puede ser extremadamente importante para la orientación de las neuronas olfatorias, debido a que ellas son guiadas hacia regiones específicas del telencéfalo mediante señales repulsivas que provienen desde la línea media del embrión (Pini 1993).

SITIO WEB 13.12 **La evidencia inicial para la quimiotaxis (The early evidence for chemotaxis).** Antes de las técnicas moleculares, los investigadores utilizaron experi-

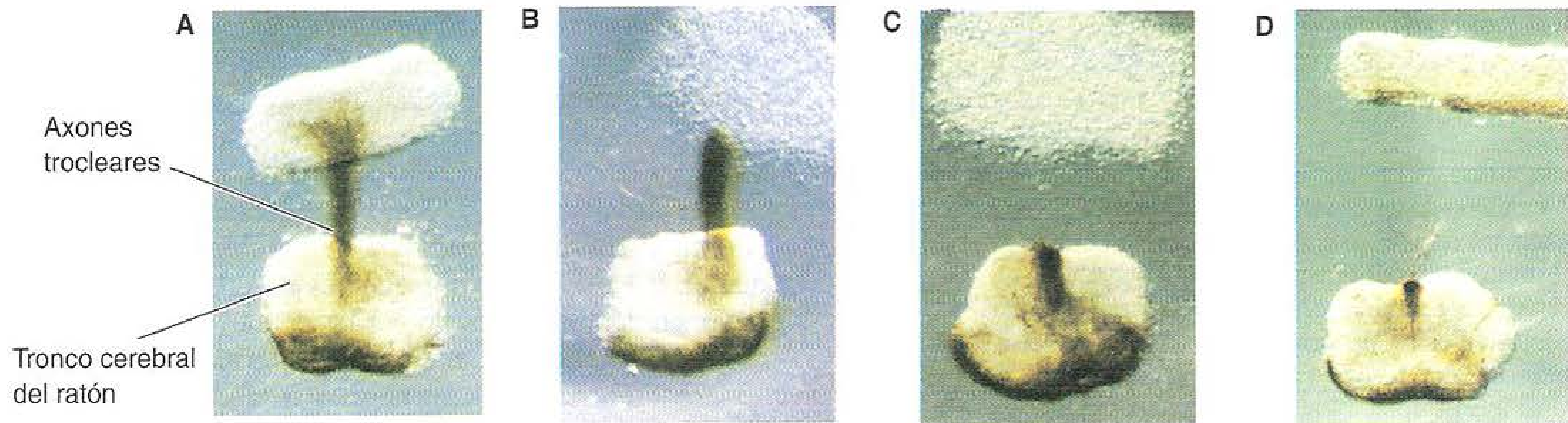


Fig. 13-25. Las netrinas inhiben la extensión de los axones trocleares desde los explantos del tronco cerebral de ratón (los tejidos más bajos). Los axones trocleares, teñidos para un antígeno específico de axón troclear, emergen dorsalmente y no son inhibidos por **A**, explantos de médula espinal dorsal o por **B**, células de fibroblasto de pollo sin alterar. Ellos son inhibidos por **C**, células fibroblásticas transgénicas que secretan netrina-1 y por **D**, un explanto de placa del piso ventral de la médula espinal secretora de netrina. (Según Colamarino y Tessier-Lavigne 1995; fotografías cortesía de M. Tessier Lavigne.)

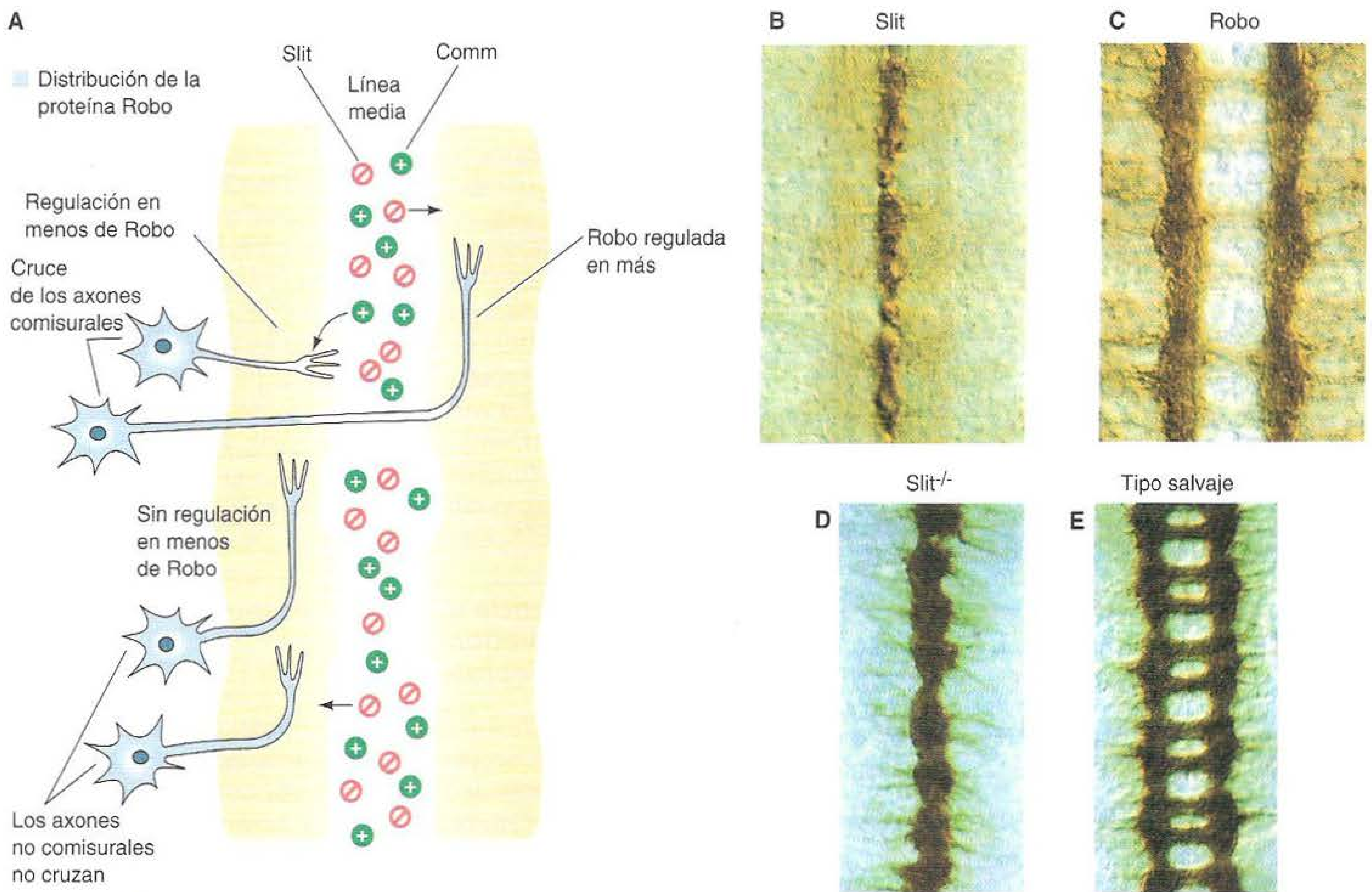


Fig. 13-26. Los factores quimiotácticos dirigen a los axones comisurales a cruzar la línea media del embrión de *Drosophila* mientras que mantienen a otros axones sobre un lado de la línea media. **A.** La línea media secreta la proteína Comm, que estimula a los axones comisurales y a la proteína Slit, que inhibe a todos los axones que expresan la proteína Robo (el receptor de Slit). Cuando alcanzan la línea media, los axones comisurales tienen poca proteína Robo o no la tienen. Por lo tanto, estimulados por Comm, estos axones pueden cruzar la línea media. Una vez que han cruzado la línea media, vuelven a expresar Robo y por esta razón no pueden retornar. Las neuronas no comisurales expresan Robo continuamente y por esta razón están inhibidas a cruzar la línea media. **B.** Expresión de la proteína Slit (como se muestra por la tinción de anticuerpo) en las neuronas de la línea media de *Drosophila*. **C.** Expresión de la proteína Robo (como se muestra por la tinción de anticuerpo) a lo largo de las neuronas de los tractos longitudinales del andamiaje axonal del SNC. **D.** Tinción del andamiaje axonal del SNC con anticuerpos para todas las neuronas del SNC en un mutante de pérdida de función para Slit muestra a los axones entrando pero fallando en dejar la línea media (en lugar de correr a lo largo de ésta). **E.** El andamiaje axonal del SNC tipo salvaje muestra la organización parecida a una escalera de las neuronas que están cruzando la línea media. (A, según Thomas 1998; **B–E**, de Kidd y col. 1999, microfotografías cortesía de C. S. Goodman.)

mentos de trasplante e ingeniosamente hallaron evidencias de que las moléculas quimiotácticas estaban siendo liberadas por los tejidos blancos de interés.

Selección del blanco de interés

Una vez que una neurona alcanza un grupo de células en el cual se encuentran sus blancos potenciales, es sensible a varias proteínas que son producidas por las células blanco. Además de las proteínas ya mencionadas, algunas células blanco producen un grupo de factores quimiotácticos denominados colectivamente **neurotrofinas**. Estas proteínas incluyen al factor de crecimiento nervioso (NGF; del inglés, *nerve growth factor*), al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*), a la neurotrofina-3 (NT-3) y a NT-4/5. Estas proteínas son liberadas desde potenciales tejidos blanco y funcionan a corto rango como cualquiera de los factores quimiotácticos o quimiorrepulsivos (Paves y Saarma 1997). Cada neurotrofina puede estimular el crecimiento de algunos axones hacia su fuente mientras inhibe a otros axones. Por ejemplo, las neuronas sensoriales desde el ganglio de la raíz dorsal de la rata son atraídas hacia las fuentes de NT-3, pero son inhibidas a crecer por BDNF (fig. 13-27).

Aunque las técnicas genéticas y bioquímicas permiten analizar el efecto de un tipo de molécula en un determinado momento, se debe recordar que cualquier cono de crecimiento está detectando un amplio rango de moléculas quimiotácticas y quimiorrepulsivas, ambas en solución y sobre el sustrato sobre el que éstos migran. Los conos de crecimiento no dependen de un único tipo de molécula para reconocer su blanco. En su lugar, ellos integran las señales de quimioatracción y de quimiorrepulsión que se presentan simultáneamente y seleccionan sus blancos de interés basados en el ingreso combinado de estas múltiples señales (Winberg y col. 1998).

SITIO WEB 13.13 **Los receptores de neurotrofina (The neurotrophin receptors).** Las neurotrofinas pueden unir a receptores

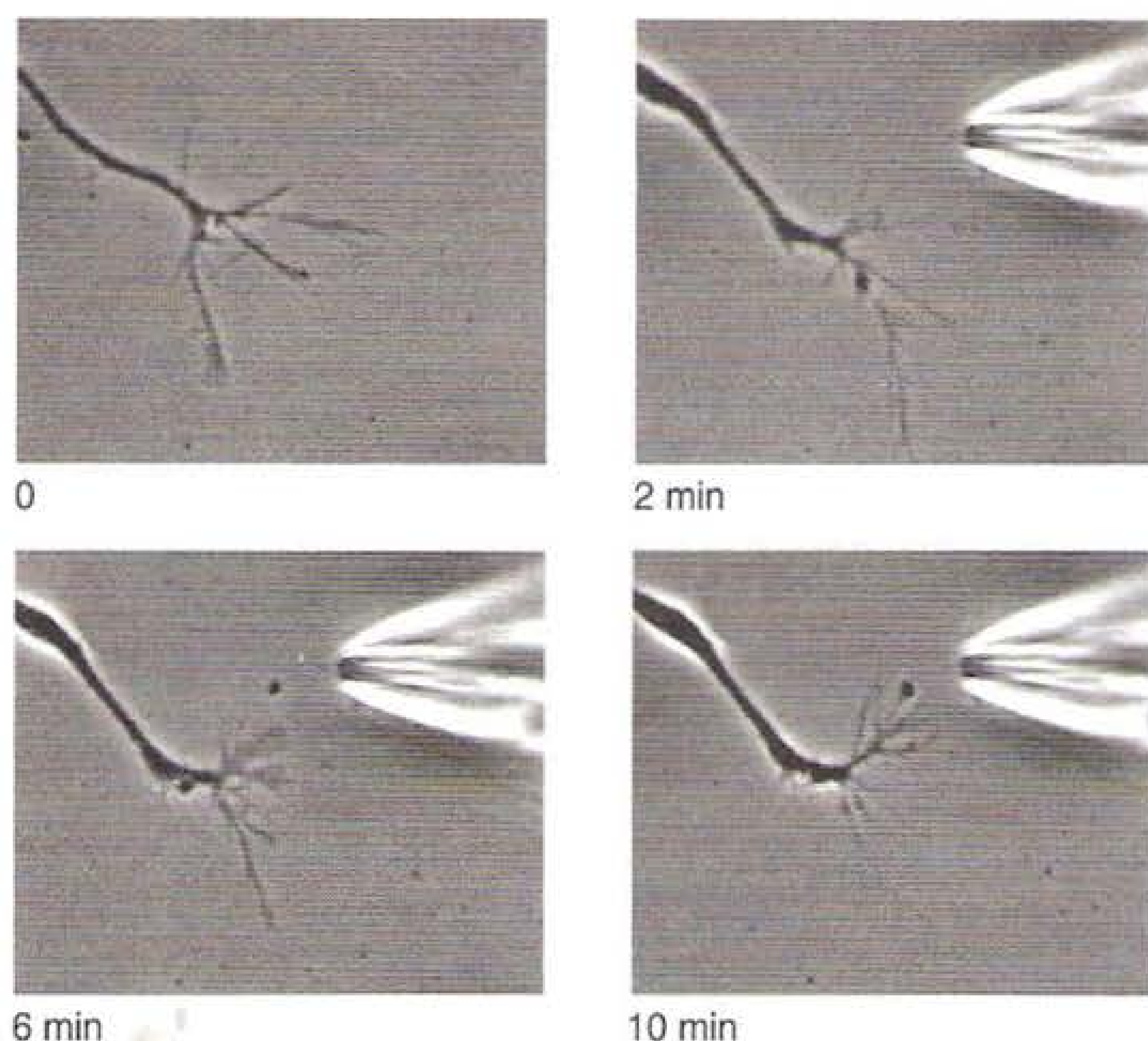


Fig. 13-27. Axón embrionario de un ganglio de la raíz dorsal de la rata que gira en respuesta a una fuente de NT-3. La microfotografía documenta el giro sobre un período de 10 minutos. El mismo cono de crecimiento fue insensible a otras neurotrofinas. (Según Paves y Saarma 1997; microfotografía cortesía de M. Saarma.)

de alta afinidad o a receptores de baja afinidad y el patrón de unión puede determinar si la señal es estimulatoria o inhibitoria.

Formación de la sinapsis: desarrollo dependiente de la actividad

Cuando un axón contacta con su blanco (en general, una célula muscular u otra neurona), forma una unión especializada denominada **sinapsis**. Los neurotransmisores del terminal del axón son liberados en estas sinapsis para despolarizar o hiperpolarizar la membrana de la célula blanco a través de la hendidura sináptica.

La construcción de la sinapsis involucra varias etapas (fig. 13-28; Burden 1998). Cuando las neuronas motoras en la médula espinal extienden sus axones a las células musculares, los conos de crecimiento que conectan a las células musculares recién formadas migran sobre sus superficies. Cuando un cono de crecimiento primero se adhiere a la membrana celular de una fibra muscular, no se observan especializaciones en las membranas. Sin embargo, el terminal del axón rápidamente comienza a acumular vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores, las membranas de ambas células aumentan su grosor en la región de contacto y la hendidura sináptica entre las células se llena con matriz extracelular que incluye una forma específica de laminina. Esta laminina derivada del músculo une específicamente a los conos de crecimiento de las neuronas motoras y puede actuar como una "señal parada" para el crecimiento axonal (Martin y col. 1995; Noakes y col. 1995). En al menos algunas sinapsis neurona-neurona, la sinapsis es estabilizada por la cadherina-N. La actividad de la sinapsis libera cadherina-N desde las vesículas de almacenamiento en el cono de crecimiento (Tanaka y col. 2000).

Después de que se ha producido el primer contacto con las células musculares, los conos de crecimiento de otros axones convergen al sitio para formar sinapsis adicionales. Durante el desarrollo, todos los músculos de mamíferos estudiados son inervados al menos por dos axones. Sin embargo, esta inervación polineuronal es transitoria. Durante la vida posnatal temprana, todas menos una de estas ramificaciones axonales se retiran. Esta "selección de la dirección" está basada en la competencia entre los axones (Purves y Lichtman 1980; Thompson 1983; Colman y col. 1997). Cuando una de las neuronas motoras es activa, ésta suprime la sinapsis de las otras neuronas, posiblemente a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico (Dan y Poo 1992; Wang y col. 1995). Finalmente, las sinapsis menos activas son eliminadas. El terminal del axón remanente se expande y es envainado por la célula de Schwann.

Supervivencia diferencial después de la inervación: factores neurotróficos

Uno de los fenómenos más enigmáticos en el desarrollo del sistema nervioso es la muerte celular neuronal. En muchas partes de los sistemas nervioso central y periférico de los vertebrados, más de la mitad de las neuronas muere durante el curso del desarrollo normal (véase cap. 6, especialmente la fig. 6-28). Además, no parece haber grandes semejanzas en los patrones de apoptosis entre las especies. Por ejemplo, en la retina del gato, cerca del 80% de las células ganglionares de la retina mueren, mientras que en la retina del pollo, esta cifra es solo del 40%. En las retinas de peces y anfibios, no parece que haya muerte neuronal de las células ganglionares (Patterson 1992).

La muerte de una neurona por apoptosis no es causada por cualquier defecto obvio en la neurona misma. En efecto, estas neuronas se han diferenciado y han extendido satisfactoriamente sus axones hacia sus blancos. En su lugar, parece que el tejido blanco regula el número de axones que lo inervan al limitar el suministro de una neurotrofina. Además de su papeles como factores quimiotácticos (véase arriba), se ha demostrado que las neurotrofinas regulan la supervivencia de distintos subgrupos de neuronas (fig. 13-29). NGF, por ejemplo, es necesario para la supervivencia de las neuronas simpáticas y de las neuronas sensoriales. El tratamiento de embriones de ratón con anticuerpos contra NGF reduce el número de neuronas simpáticas trigeminales y del ganglio de la raíz dorsal al 20% de sus números control (Levi-Montalcini y Booker 1960; Pearson y col. 1983). Además, la extirpación de los tejidos blanco de estas neuronas provoca la muerte celular de las neuronas que los deberían haber inervado y hay una buena correlación entre la cantidad de NGF secretado y la supervivencia de las neuronas que inervan a estos tejidos (Korsching y Thoenen 1983; Harper y Davies 1990). BDNF no afecta a las neuronas simpáticas o a las sensoriales, pero puede rescatar in vivo de la muerte celular que se produce normalmente en las neuronas motoras fetales y rescatar también de la muerte celular que es inducida luego de la extirpación de su tejido blanco. Los resultados de estos estudios in vitro han sido corroborados por experimentos de knockout génico, por medio de los cuales la supresión de factores neuro-

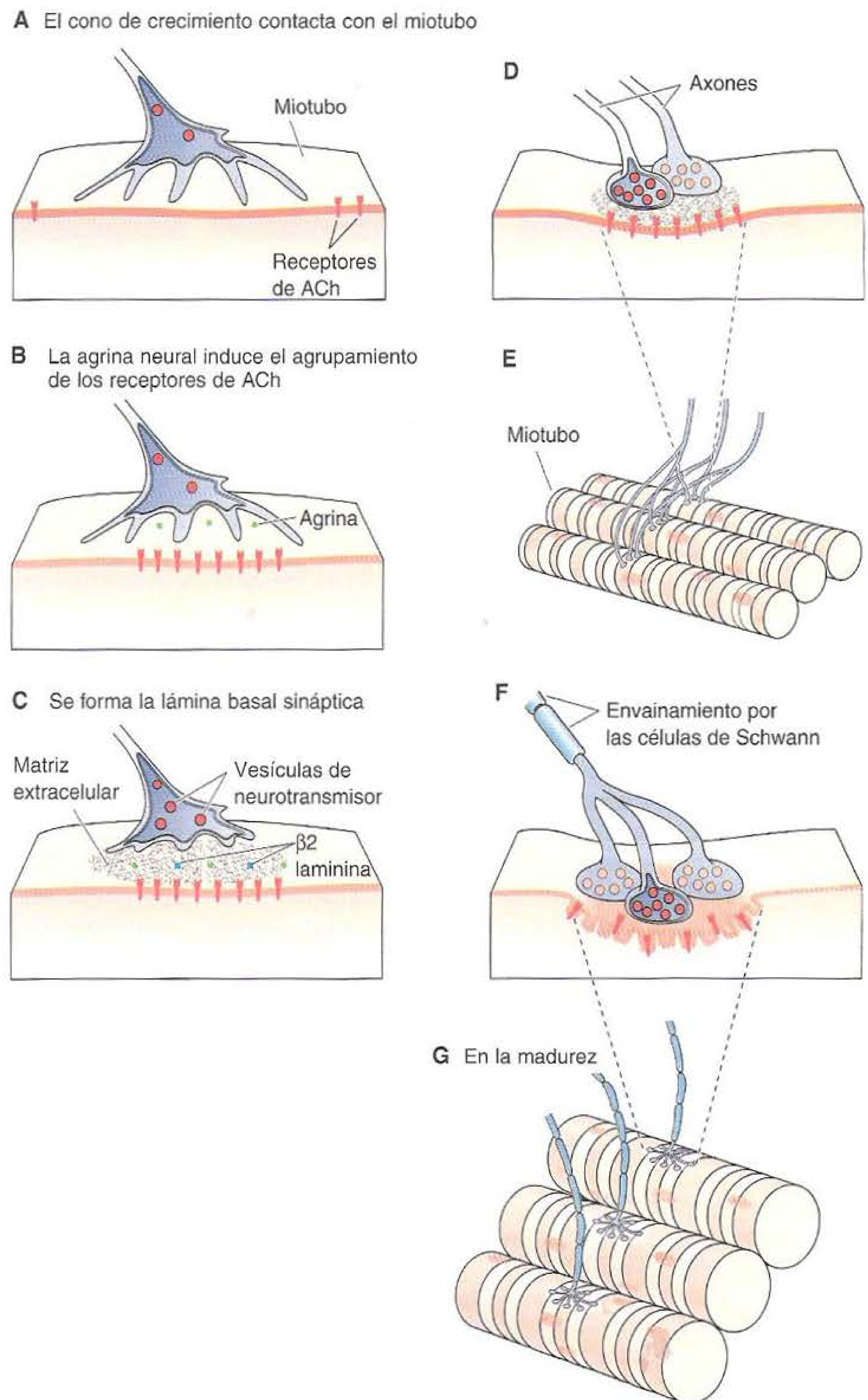


Fig. 13-28. Diferenciación de la sinapsis de una neurona motora con una célula muscular. Las partes E y G están representadas a un aumento más bajo que las otras para dar una visión general de la región donde los axones se encuentran con el músculo. **A.** Un cono de crecimiento se aproxima a una célula muscular en desarrollo. **B.** El axón se detiene y forma un contacto no especializado sobre la superficie del músculo. Agrina, una proteína liberada por la neurona, hace que los receptores de acetilcolina (ACh) se agrupen cerca del axón. **C.** Las vesículas de los neurotransmisores ingresan en el terminal del axón y una matriz extracelular conecta el axón terminal a la célula muscular a medida que se amplía la sinapsis. La matriz contiene una laminina específica de nervios. **D.** Otros axones convergen sobre el mismo sitio sináptico. **E.** Perspectiva general de la inervación muscular por varios axones (visto en mamíferos al nacimiento). **F.** Todos los axones menos uno son eliminados. El axón remanente puede ramificarse para formar un complejo de unión con el músculo. Cada terminal del axón es envainado por el proceso de una célula de Schwann y se forman pliegues en la membrana celular del músculo. **G.** Perspectiva general de la inervación del músculo varias semanas después del nacimiento. (Según Hall y Sanes 1993; Purves 1994; Hall 1995.)

tróficos particulares causan la pérdida de solamente ciertos subgrupos de neuronas (Crowley y col. 1994; Jones y col. 1994).

Los factores neurotróficos son producidos continuamente en los adultos y la pérdida de estos factores puede producir enfermedades debilitantes. BDNF es requerido para la supervivencia de un subgrupo particular de neuronas en el estriado (una región del cerebro involucrada en la modulación de la intensidad de la actividad muscular coordinada, tales como los movimientos de equilibrio y marcha) y le permite a estas neuronas diferenciarse y sintetizar el receptor para dopamina. BDNF en esta región del cerebro es regulado en más por huntingtin, una proteína que está mutada en la **enfermedad de Huntington.** Los pacientes con enfermedad de Huntington han *disminuido la producción de BDNF, lo que lleva a la* muerte de las neuronas estriatales (Guillin y col. 2001; Zuccato y col. 2001). El resultado es una serie de anomalías cognitivas, movimientos musculares involuntarios y finalmente la muerte. Otra neurotrophic, el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF, del inglés, *glial all line-derived*), potencia la supervivencia de otro grupo de neuronas: las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio cuya destrucción caracteriza a la **enfermedad de Parkinson** (Lin y col. 1993). Estas neuronas envían axones hacia el estriado (cuya capacidad para responder a sus señales de dopamina es dependiente de BDNF). GDNF puede evitar la muerte celular de estas neuronas en los cerebros de adultos (véase Lindsay 1995) y está siendo considerado como una terapia para esta enfermedad (Zurn y col. 2001).

La supervivencia real de cualquier neurona en el embrión puede depender de una combinación de agentes. Schmidt y Kater (1993) han demostrado que los factores neurotróficos, la despolarización (activación) y las interacciones con el sustrato se combinan todas sinérgica-

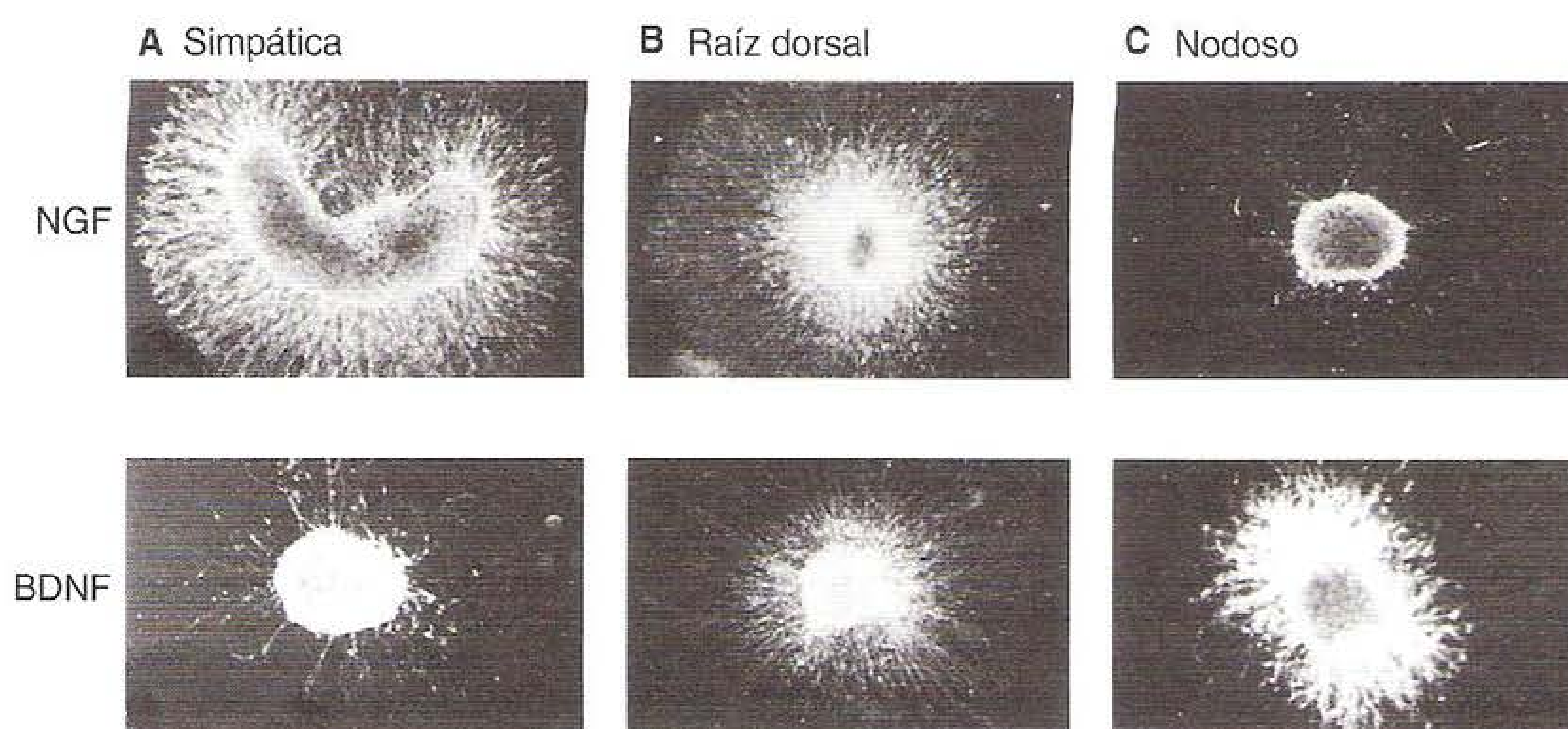


Fig. 13-29. Efectos de NGF (fila superior) y BDNF (inferior) de las extensiones axonales de los ganglios, A, simpáticos, B, de la raíz dorsal y C, nodoso (percepción del gusto). Mientras que NGF y BDNF tenían un efecto estimulatorio leve sobre la extensión axonal del ganglio de la raíz dorsal, el ganglio simpático responde espectacularmente a NGF y apenas a BDNF, mientras que para el ganglio nodoso sucedió a la inversa. (De Ibáñez y col. 1991.)

mente para determinar si una neurona sobrevive. Por ejemplo, la supervivencia de la neuronas del ganglio ciliar del pollo en cultivo fue estimulada por FGF, laminina o despolarización. Sin embargo, FGF no promovía la supervivencia cuando la laminina estaba ausente y los efectos combinados de la laminina, FGF y la despolarización fueron mayores que los efectos sumados de cada uno de ellos (fig. 13-30). Los factores neurotróficos y otros agentes ambientales parecen funcionar mediante la supresión de un "programa suicida" apoptótico que podría ser expresado constitutivamente a menos que sea reprimido por estos factores (Raff y col. 1993). La supervivencia de las células ganglionares de la retina en cultivos depende de factores neurotróficos pero estas células pueden responder a estos factores solamente si ellas han sido despolarizadas (Meyer-Franke y col. 1995). Además, debido a que la actividad neuronal estimula la producción de neurotrofinas por los nervios activos, es probable que las neuronas que reciban una señal produzcan más neurotrofinas (Thoenen 1995). Estos factores podrían tener un efecto sobre sinapsis cercanas que son activas (es decir, capaces de responder a las neurotrofinas), estabilizando de este modo a un grupo de sinapsis activas con la exclusión a las inactivas.

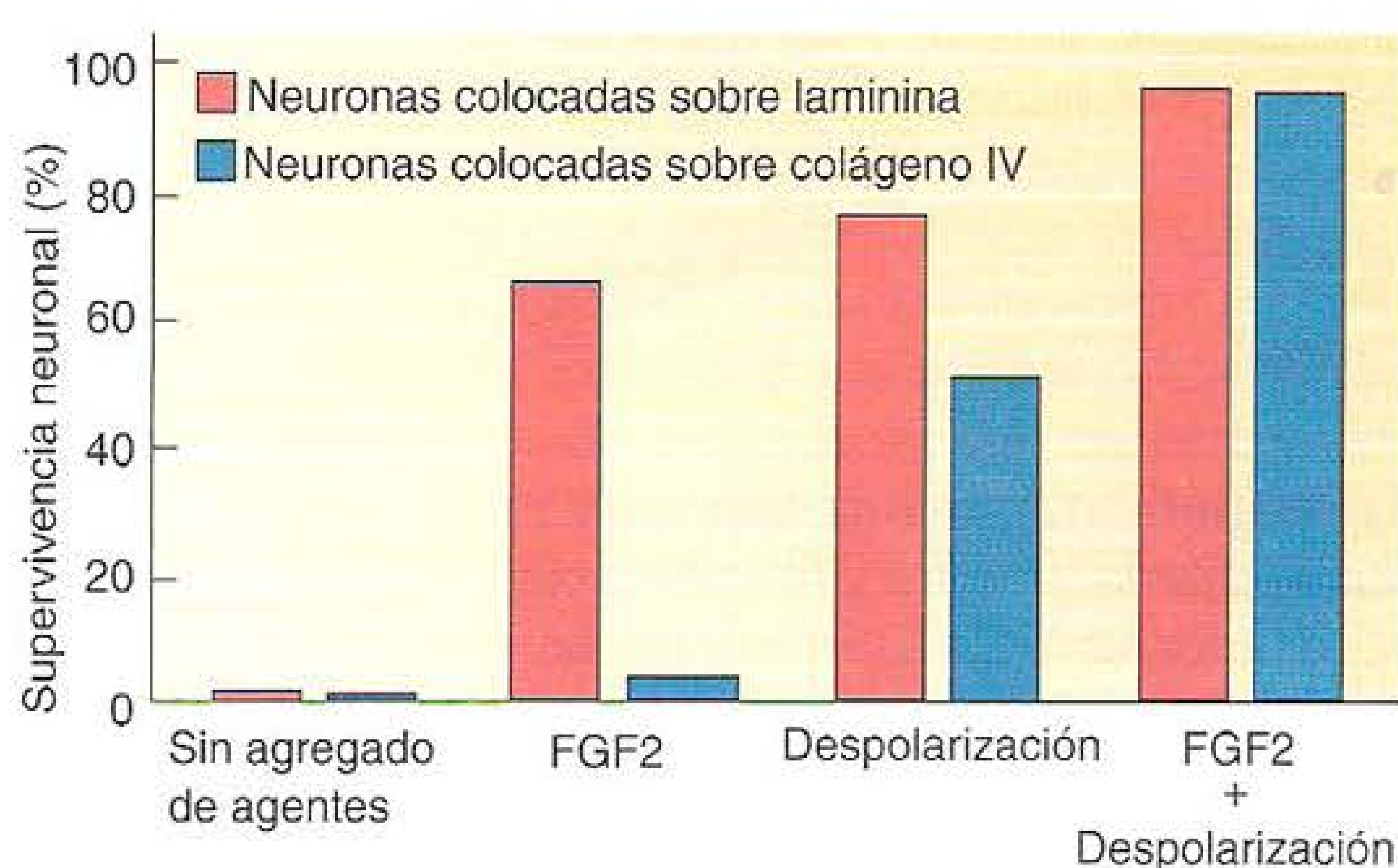


Fig. 13-30. Interacciones entre los efectos de sustrato, despolarización y la neurotrofina básica de FGF (FGF2) en la supervivencia de las neuronas del ganglio ciliar. Las neuronas fueron colocadas sobre laminina (un sustrato que potencia la supervivencia) o colágeno IV (que no potencia la supervivencia de la neurona) y observadas después de 24 horas de cultivos ante la presencia o ausencia de despolarización o FGF2. Cuando las células fueron despolarizadas y crecieron ante la presencia de FGF2, no importaba sobre qué sustancia crecían. Sin embargo, cuando FGF2 estaba presente sin despolarización, el sustrato produjo una gran diferencia. (De Schmidt y Kater 1993.)

Los caminos a la gloria: migración de los axones ganglionares de la retina

Casi todos los mecanismos para la especificación neuronal y especificidad axonal mencionados en este capítulo pueden ser vistos en el modo en el que las neuronas individuales de la retina envían sus axones hacia las áreas apropiadas del cerebro. Incluso cuando los neuronas son trasplantadas muy lejos del ojo, son capaces de encontrar estas áreas (Harris 1986). La capacidad del cerebro para guiar los axones de neuronas traslocadas hacia sus sitios blanco apropiados implica que las señales de orientación no se distribuyen únicamente a lo largo del camino normal, sino que existen en todo el cerebro embrionario. La guía de un axón desde el cuerpo de la célula nerviosa hasta su destino a través del embrión es un proceso complejo y varios tipos de señales pueden ser utilizados simultáneamente para asegurar que son establecidas las conexiones correctas. Aunque aquí se están estudiando a vertebrados no mamíferos, el proceso descrito se aplica también a los mamíferos.

CRECIMIENTO DEL AXÓN DE LA CÉLULA GANGLIONAR DE LA RETINA HACIA EL NERVIO ÓPTICO. Las primeras etapas de los axones ganglionares de la retina para alcanzar sus regiones específicas del tectum óptico tienen lugar dentro de la retina (fig. 13-31A). A medida que las células ganglionares de la retina se diferencian, su posición en el margen interno de la retina es determinada por moléculas cadherina (cadherina-N así como cadherina-R específica de la retina) sobre sus membranas celulares (Matsunaga y col. 1988; Inuzuka y col. 1991). Sus axones crecen a lo largo de la superficie interna de la retina hacia el disco óptico, la cabeza del nervio óptico (fig. 13-31B). El nervio óptico humano maduro contendrá más de un millón de axones ganglionares de la retina.

La adhesión y el crecimiento de los axones ganglionares de la retina a lo largo de la superficie interna de la retina puede ser determinada por su lámina basal que contiene laminina. Sin embargo, la simple adhesión a la laminina no puede explicar la direccionalidad de este crecimiento. N-CAM parece ser especialmente importante aquí, debido a que la migración direccional de los conos

de crecimiento ganglionares de la retina depende de los pies terminales de las células gliales que expresan N-CAM en la superficie interna de la retina (Stier y Schlosshauer 1995). La secreción de netrina-1 por las células del disco óptico (donde los axones se están ensamblando para formar el nervio óptico) también probablemente juega un papel en esta migración. Los ratones que carecen de los genes de netrina-1 (o los genes para el receptor de netrina encontrado en los axones ganglionares de la retina) han formado mal los nervios ópticos, tanto que los axones fallan en dejar el ojo y crecen azarosamente alrededor del disco (Deiner y col. 1997). El proteoglucano condroitín sulfato, un factor repulsivo para las neuronas de la retina, puede proporcionar el empuje hacia el disco (Hynes y Lander 1992).

Cuando llegan al nervio óptico, los axones forman fascículos con los axones que ya estaban presentes allí. N-CAM es crítica para esta formación de fascículos y los anticuerpos contra N-CAM (o la eliminación de su componente de ácido polisiálico) hacen que los axones ingresen al nervio óptico de un modo desordenado, que a su vez hace que ellos surjan en posiciones erróneas en el tectum (fig. 13-31C; Thanos y col. 1984; Yin y col. 1985)

CRECIMIENTO DE LOS AXONES GANGLIONARES DE LA RETINA A TRAVÉS DEL QUIASMA ÓPTICO. Cuando los axones entran al nervio óptico, crecen sobre las células gliales hacia el cerebro medio. En los vertebrados no mamíferos, los axones irán hacia una porción del cerebro denominada el tectum óptico. (Los axones de mamíferos van hacia los núcleos geniculados laterales; esta vía será discutida más adelante en el capítulo 22). Los estudios in vitro sugieren que numerosas moléculas de adhesión –N-CAM, cadherinas e integrinas– juegan papeles en la orientación del axón hacia el tectum óptico (Neugebauer y col. 1988).

En el momento de ingreso al cerebro, las axones ganglionares de la retina alcanzan el quiasma óptico, donde ellos tienen que "decidir" si continúan en línea recta o si giran 90º y entran al otro lado del cerebro (fig. 13-31D). Parece que aquellos axones que no están destinados a cruzar hacia el otro lado del cerebro son repelidos de hacerlo cuando ingresan al quiasma óptico (Godement y col. 1990). La base de esta repulsión parece ser la síntesis de efrina sobre las neuronas en el quiasma (Cheng y col. 1995; Marcus y col. 2000). Dos moléculas de guía, la molécula de adhesión L1 y la laminina, parecen estimular el cruce del quiasma.

En su camino hacia el tectum óptico, los axones de los vertebrados no mamíferos viajan sobre un camino (el tracto óptico) sobre las células gliales cuyas superficies están cubiertas con laminina (fig. 13-31-E). Muy pocas áreas del cerebro contienen laminina y la laminina existe en estos senderos solo cuando las fibras del nervio óptico están creciendo hacia éste (Cohen y col. 1987).

SELECCIÓN DEL BLANCO DE INTERÉS. Cuando los axones llegan al final del tracto óptico revestido por laminina (fig. 13-31F), se extienden y encuentran sus blancos específicos en el tectum óptico. Los estudios en ranas y peces (en los que las neuronas de la retina de cada ojo proyectan al lado opuesto del cerebro) han indicado que cada axón ganglionar de la retina envía sus impulsos a un sitio específico (una célula o un pequeño grupo de células) dentro del tectum óptico (Sperry 1951). Como se muestra en la figura 13-32, hay dos tectum ópticos en el cerebro de la rana. Los axones del ojo derecho forman sinapsis con el tectum óptico izquierdo, mientras que aquellos desde el ojo izquierdo forman sinapsis con el tectum óptico derecho. El crecimiento de los axones en el tracto óptico del *Xenopus* parece ser mediado por los factores de crecimiento fibroblástico secretados por las células que revisten el tracto. Los axones ganglionares de la re-

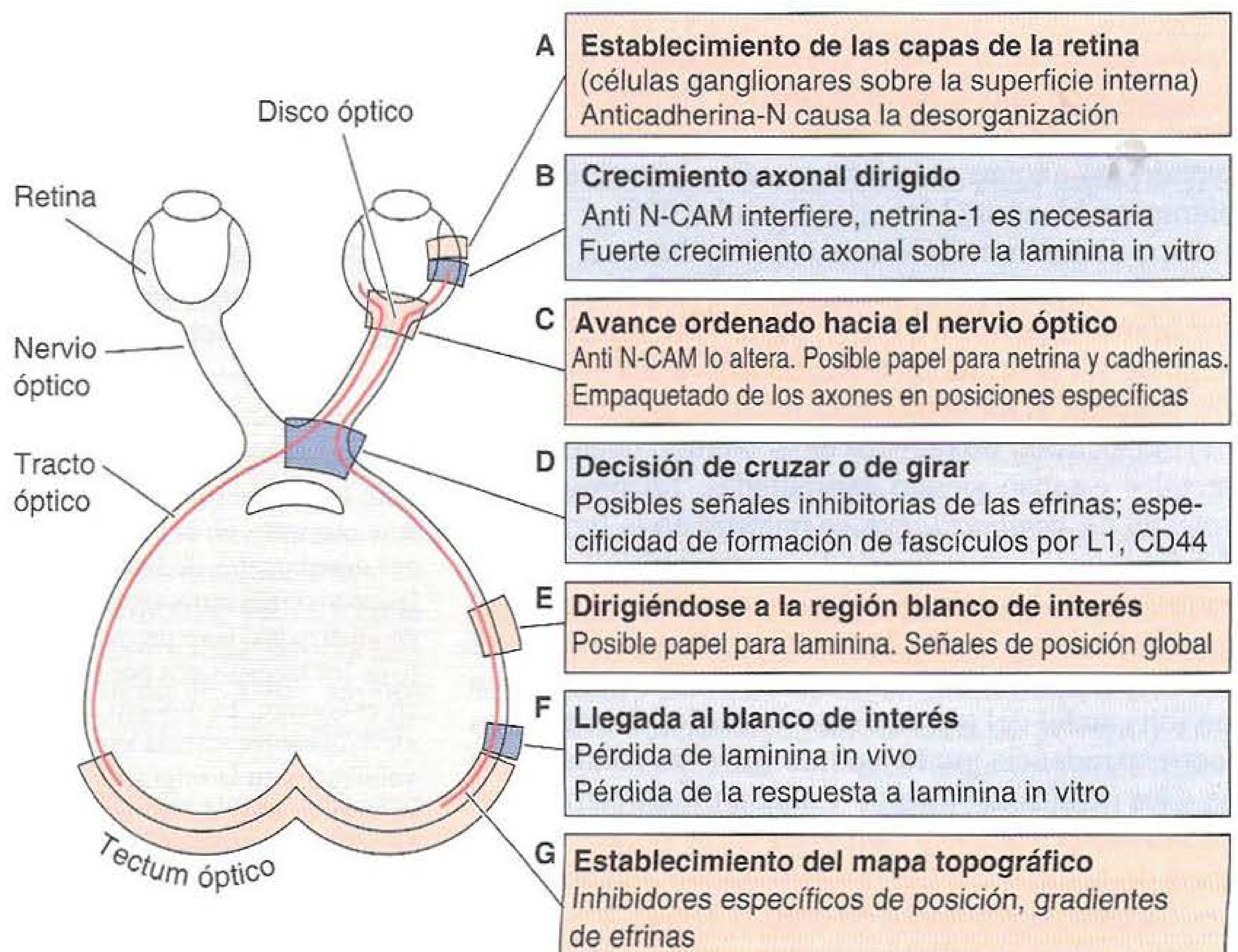


Fig. 13-31. Múltiples señales de orientación dirigen los movimientos de los axones ganglionares de la retina hacia el tectum óptico. (Según Hynes y Lander 1992.)

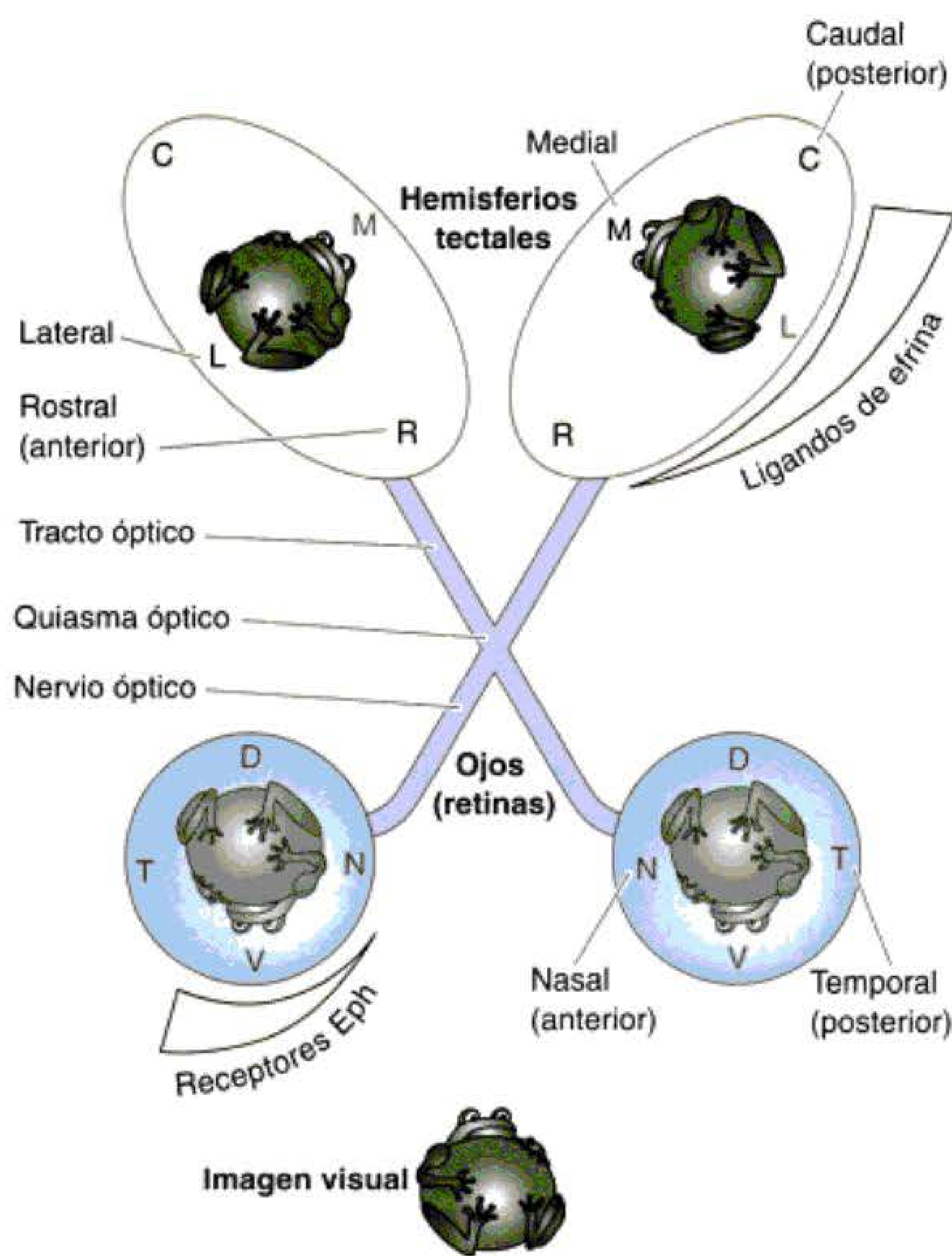


Fig. 13-32. Mapa de la proyección retinotectal normal en *Xenopus* adulto. El ojo derecho inerva al tectum izquierdo y el ojo izquierdo inerva al tectum derecho. La porción dorsal de la retina (D) inerva a las regiones laterales (L) del tectum. La región nasal (anterior) de la retina proyecta hacia la región caudal del tectum (C). (Según Holt 2002; cortesía de C. Holt.)

tina expresan receptores de FGF en sus conos de crecimiento. Sin embargo, a medida que los axones alcanzan el tectum, la cantidad de FGF disminuye rápidamente, tal vez yendo los axones más lentamente y permitiéndoles encontrar sus blancos (McFarlane y col. 1995).

El mapa de las conexiones de la retina hacia el tectum óptico de la rana (la proyección retinotectal) fue detallado por Marcus Jacobson (1967). Jacobson creó este mapa luego de hacer brillar un estrecho haz de luz sobre una región pequeña y limitada de la retina y anotando, mediante un electrodo de registro en el tectum, cuáles células tectales estaban siendo estimuladas. La proyección retinotectal de *Xenopus laevis* se muestra en la figura 13-32. La iluminación con luz de las partes ventrales de la retina estimula a las células sobre la superficie lateral del tectum. Del mismo modo, la luz centrada sobre la parte temporal (posterior) de la retina estimula a las células en la porción caudal del tectum. Estos estudios demostraron una correspondencia punto a punto entre las células de la retina y las células del tectum. Cuando un grupo de células de la retina es activado, un grupo muy pequeño y específico de células tectales es estimulado. Además, los puntos forman un continuo; en otras palabras, los puntos adyacentes sobre la retina proyectan sobre puntos adyacentes del tectum. Esta organización le permite a la rana ver una imagen intacta. Esta complicada especificidad llevó a Sperry (1965) a postular la hipótesis de la quimioafinidad:

> *Los complicados circuitos del cerebro crecen, se ensamblan y autoorganizan mediante el uso de intricados códigos químicos bajo control genético. Temprano en el desarrollo, las células nerviosas, que se cuentan por millones, adquieren y retienen después, etiquetas de identificación individuales, de naturaleza química, por las que pueden distinguirse y reconocerse entre sí.*

Las teorías actuales no proponen una especificidad punto a punto entre cada axón y la neurona que ésta contacta. En su lugar, la evidencia ahora demuestra que los gradientes de adhesividad (especialmente aquellos involucrados en la repulsión) juegan un papel en definir los territorios en los que entran los axones y que esta actividad que conduce la competencia entre estas neuronas determina la conexión final de cada axón.*

ESPECIFICIDADES ADHESIVAS EN DIFERENTES REGIONES DEL TECTUM ÓPTICO. Hay buena evidencia de que las células ganglionares de la retina pueden distinguir entre regiones del tectum óptico. Las células tomadas de la mitad ventral de la retina neural del pollo se adhieren preferencialmente a las mitades dorsales (medial) del tectum y viceversa (Roth y Marchase 1976; Gottlieb y col. 1976; Halfter y col. 1981).

Las células ganglionares de la retina son especificadas a lo largo del eje dorsoventral mediante un gradiente de factores de transcripción. Las células de la retina dorsal están caracterizadas por altas concentraciones del factor de transcripción Tbx5, mientras que las células de la retina ventral tienen altos niveles de Pax2. Estos factores de transcripción son inducidos por factores paracrinos (BMP4 y ácido retinoico, respectivamente) desde los tejidos vecinos (Koshiba-Takeuchi y col. 2000). La expresión ectópica de Tbx en la retina temprana de pollo resulta en notables anomalías de proyección retinotectal. Por lo tanto, las células ganglionares de la retina son especificadas de acuerdo a su localización.

* En los últimos años, los investigadores han descubierto docenas de mutaciones en el pez cebra que afectan la migración de los axones ganglionares de la retina hacia el tectum o la especificidad de las conexiones retinotectales. Estos mutantes solo ahora están siendo analizados, pero prometen proporcionar un mayor entendimiento de los mecanismos por el cual las aferencias sensoriales ingresan en el cerebro. El número de diciembre de 1996 (volumen 123) de *Development* contenía varios artículos que mapeaban los genes involucrados en la migración del axón desde la retina hacia la corteza óptica. Más de 30 genes mutantes han sido encontrados que afectan la capacidad de los axones ganglionares retinales del pez cebra para encontrar el tectum óptico o la capacidad de los axones para encontrar su conexiones apropiadas dentro del tectum (Karlstrom y col. 1997).

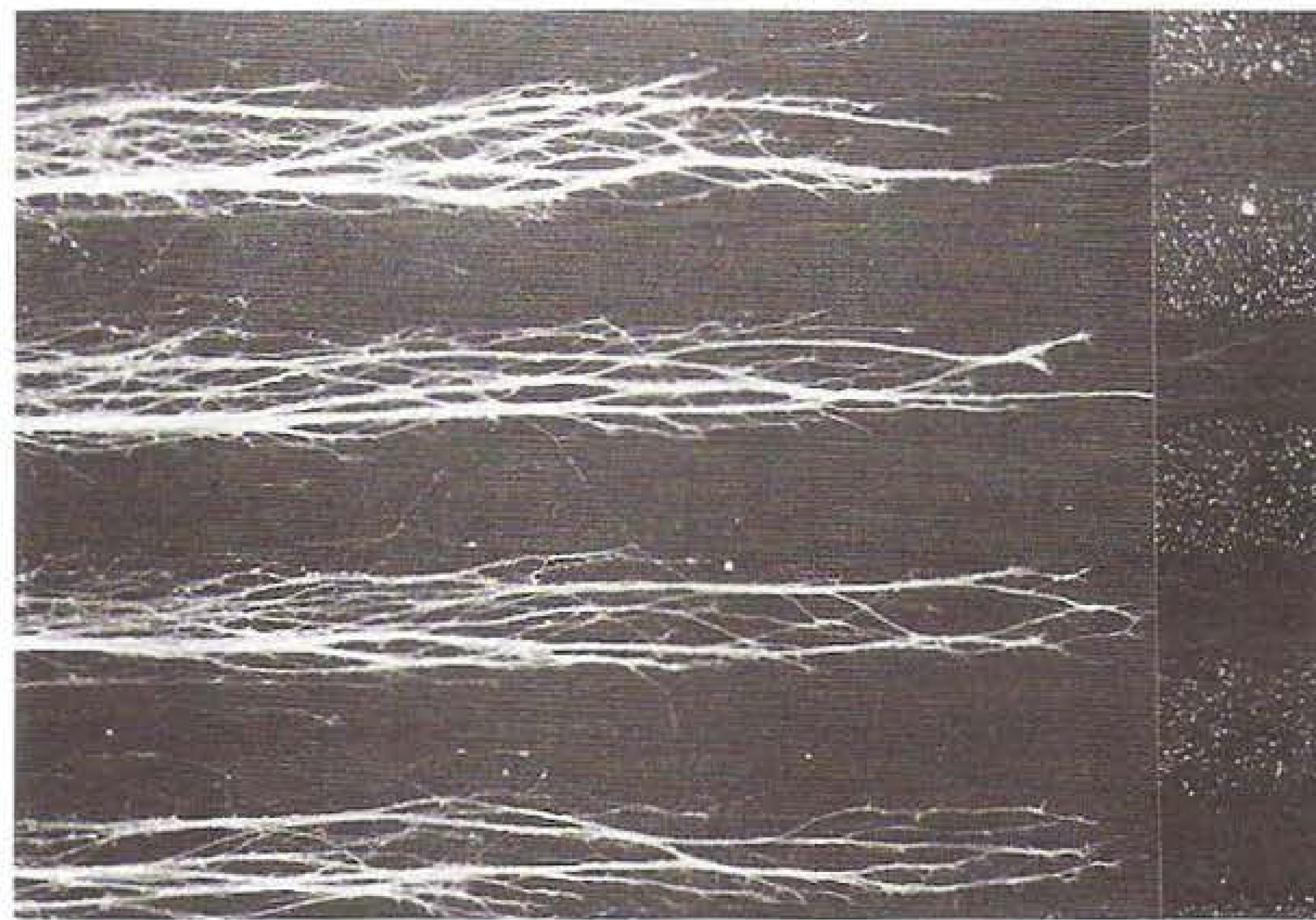


Fig. 13-33. Repulsión diferencial de los axones ganglionares de la retina temporal sobre membranas tectales. Tiras alternadas de membranas tectales anteriores y posteriores fueron absorbidas sobre papel de filtro. Cuando los axones de las células ganglionares de la retina temporal (posterior) crecieron en tales alfombras alternadas, extendieron preferencialmente los axones sobre las membranas tectales anteriores. (De Walter y col. 1987.)

Un gradiente que ha sido identificado funcionalmente es un gradiente de repulsión que es más elevado en el tectum posterior y disminuye en el tectum anterior. Bonhoeffer y sus colegas (Walter y col. 1987; Baier y Bonhoeffer 1992) prepararon una "alfombra" de membranas tectales con tiras alternadas derivadas del tectum posterior y del tectum anterior. Ellos, a continuación, dejaron células de las regiones nasal (anterior) o temporal (posterior) de la retina extendiendo axones hacia esta alfombra. Las células ganglionares de la porción nasal de la retina extendieron sus axones igualmente bien sobre las membranas tectales anterior y posterior. Las neuronas del lado temporal de la retina, sin embargo, extendieron sus axones solamente sobre las membranas tectales anteriores (fig. 13-33). Cuando el cono de crecimiento de un axón ganglionar de la retina temporal contactó a una membrana celular tectal posterior, el filopodia del cono de crecimiento se retiró y el cono de crecimiento colapsó y se retrajo (Cox y col. 1990).

Las bases para esta especificidad parecen ser los gradientes de las proteínas efrinas y sus receptores. En el tectum óptico, las proteínas efrinas (especialmente efrinas A2 y A5) son encontradas en gradientes que son más elevados en el tectum posterior (caudal) y disminuyen hacia anterior (rostralmente) (fig. 13-34A). Además, las proteínas efrinas clonadas tienen la capacidad para generar repulsión en los axones (fig. 13-34B), y la efrina expresada ectópicamente le impedirá a los axones de las regiones temporales (pero no de la nasal) de la retina que proyecten a donde ésta es expresada (Drescher y col. 1995; Nakamoto y col. 1996). Los receptores Eph complementarios han sido encontrados sobre las células ganglionares de la retina del pollo y son expresados en gradiente temporal hacia nasal a lo largo de los axones ganglionares de la retina (Cheng y col. 1995). Parece que hay varios receptores de Eph y ligandos en el tectum y en la retina y pueden jugar papeles de empujar y atraer en la guía de los axones ganglionares retinianos temporales hacia el tectum anterior y permitiéndole a los axones ganglionares retinianos nasales proyectar hacia la porción posterior del tectum.

La formación de sinapsis dependiente de la actividad también parece estar involucrada en los estadios finales de proyecciones retinianas hacia el cerebro. En embriones de rana, ave y roedor tratados con tetrodotoxina, los axones crecerán normalmente hacia sus territorios respectivos y harán sinapsis con las neuronas tectales. Sin embargo, el mapa retinotectal es tosco, y carece de resolución precisa. Así como en la especificación final de las sinapsis de las neuronas motoras, la actividad neural es necesaria para la proyección retiniana punto a punto sobre las neuronas tectales (Harris 1984; Fawcett y O'Leary 1985; Kobayashi y col. 1990). La puesta a punto del mapa retinotectal involucra al receptor de NMDA, una proteína sobre las neuronas tectales. Cuando el receptor de NMDA es inhibido, la resolución a una fina escala no se obtiene (Debski y col. 1990). Parece que NMDA puede estar coordinando las interacciones entre óxido nítrico (NO) y BDNF (Wu y col. 1994; Ernst y col. 1999; Cogen y Cohen-Cory 2000). El óxido nítrico está involucrado en la eliminación de los axones retinianos que erraron de blanco, mientras que BDNF puede estabilizar conexiones axonales retinianas. Parece que NO induce el colapso del cono de crecimiento y la retracción de los axones retinianos en desarrollo, mientras que BDNF protege a los conos de crecimiento y axones de los efectos del NO (Ernst y col. 2000). La exposición a BDNF y NO, pero no a cada factor por separado, estabiliza los conos de crecimiento y los axones. La formación de sinapsis dependientes de la actividad es extremadamente importante durante el desarrollo del sistema visual de mamíferos y este proceso será detallado en el capítulo 22.

El desarrollo de las conductas: constancia y plasticidad

Uno de los aspectos más fascinantes de la neurobiología del desarrollo es la correlación de ciertas conexiones neuronales con ciertas conductas. Hay dos aspectos destacables de este fenómeno. En primer lugar, hay casos en los que patrones de conducta complejos están intrínsecamente presentes en el "circuito" del cerebro al nacimiento. El latido cardíaco de un embrión de pollo de 19 días se acelera cuando oye una llamada de peligro y ninguna otra llamada podría provocar esta respuesta (Gottlieb 1965). Además, un pollo recién eclosionado buscará inmediatamente el refugio si se presenta la sombra de un halcón. Un halcón verdadero no es necesario; la sombra proyectada por una silueta de papel sería suficiente y la sombra de ninguna otra ave causará esta respuesta (Tin-

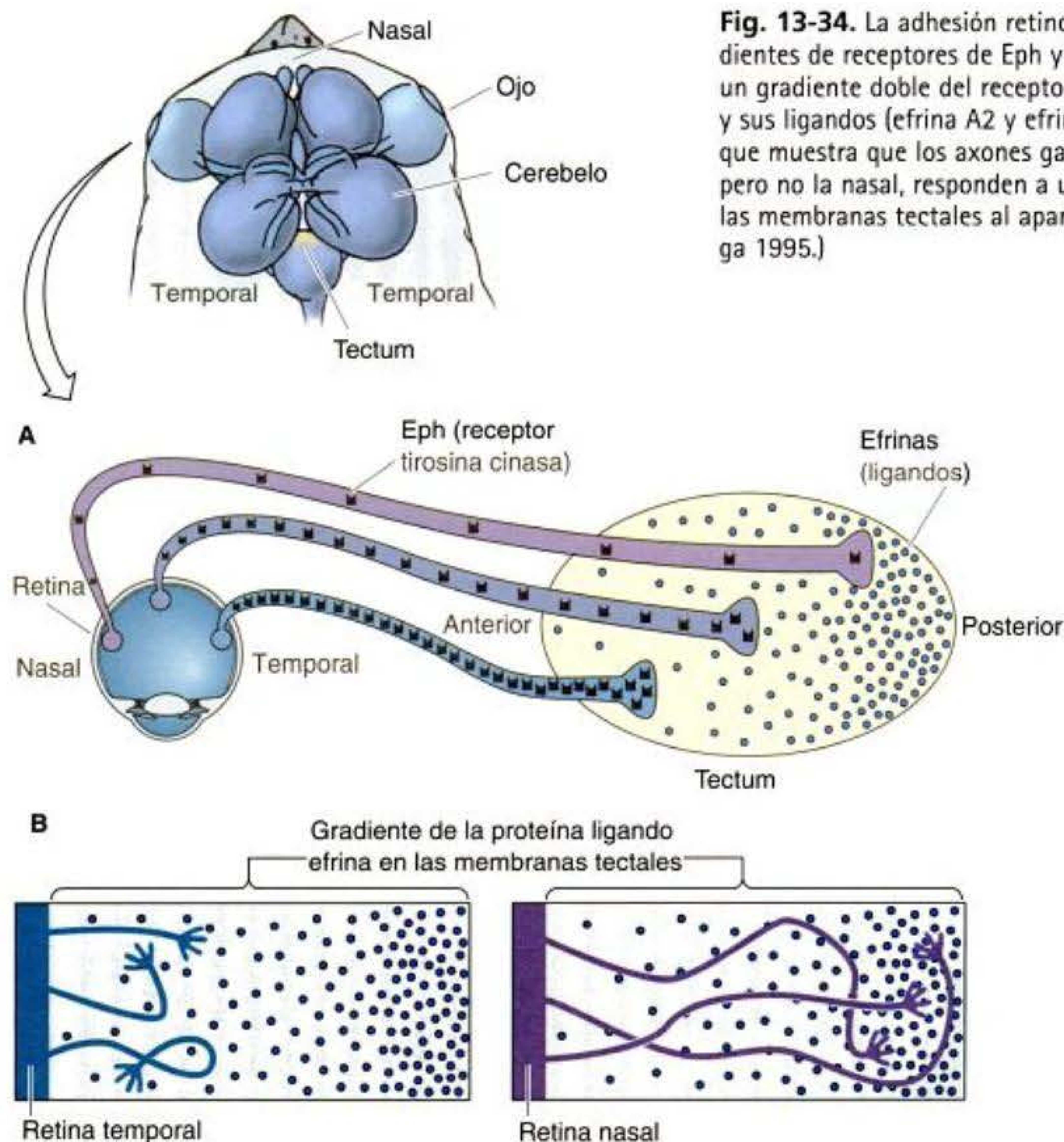


Fig. 13-34. La adhesión retinotectal diferencial es guiada por gradientes de receptores de Eph y sus ligandos. **A.** Representación de un gradiente doble del receptor Eph de tirosina cinasa en la retina y sus ligandos (efrina A2 y efrina A5) en el tectum. **B.** Experimento que muestra que los axones ganglionares de la retina temporal, pero no la nasal, responden a un gradiente de ligando de efrina en las membranas tectales al apartarse o enlentecerse. (Según Barinaga 1995.)

bergen 1951). Es aparente, entonces, que hay ciertas conexiones neuronales que conducen a conductas "integradas o innatas" en los vertebrados.

Igualmente destacables son aquellos ejemplos en los que el sistema nervioso es tan plástico que nuevas experiencias pueden modificar el grupo original de conexiones neuronales, y producir la creación de nuevas neuronas o la formación de nuevas sinapsis entre las neuronas existentes. Se discutirá la plasticidad neural extensamente en el capítulo 22, pero es suficiente decir aquí que el cerebro no detiene su desarrollo en el nacimiento. La investigación ganadora del premio Nobel de Hubel y Wiesel (1962, 1963) demostró que hay una competencia entre las neuronas retinianas de cada ojo por los blancos de interés en la corteza y que sus conexiones deben ser reforzadas por la experiencia. Como se mencionó en el capítulo anterior, las nuevas experiencias conducen a la generación de nuevas neuronas en las aves y mamíferos adultos. Por lo tanto, el sistema nervioso continúa su desarrollo en la vida adulta y el patrón de las conexiones neuronales es un producto del patrón heredado y del patrón que se produce por la experiencia.

Como un investigador (Purves 1994) concluyó sus análisis del desarrollo del cerebro:

> *Aunque la vasta mayoría de su construcción debe originarse de programas de desarrollo establecidos durante la evolución de cada especie, la actividad neural puede modular e instruir este proceso, almacenando así la riqueza de información idiosincrásica que cada uno de nosotros adquiere por la experiencia y la práctica individuales.*

Resumen: células de la cresta neural y especificidad axonal

1. La cresta neural es una estructura transitoria. Sus células migran para llegar a ser diferentes tipos celulares.
2. Las células de la cresta neural del tronco migran en sentido dorsolateral hacia el ectodermo, donde se convierten en melanocitos. Ellas también pueden migrar ventralmente, llegando a ser neuronas simpáticas y parasimpáticas, y células de la médula suprarrenal.
3. Las células de la cresta neural craneal entran en los arcos faríngeos para convertirse en el cartílago de la mandíbula y los huesos del oído medio. Ellas también forman los huesos del proceso frontonasal, la papila del diente y participan en la formación de los

nervios craneales (neuronas de los ganglios y células de Schwann).

4. La cresta neural cardíaca ingresa al corazón y forma la separación entre la arteria pulmonar y la aorta.
5. La formación de la cresta neural depende de interacciones entre la epidermis prospectiva y la placa neural. Los factores paracrinos desde estas regiones inducen la formación de factores de transcripción que permiten la migración de las células de la cresta neural.
6. El camino que toma una célula de la cresta neural depende de la matriz extracelular con la que ésta se encuentra.
7. Las células de la cresta neural del tronco migran a través de la porción anterior de cada esclerotoma, pero no a través de la porción posterior de un esclerotoma. Las proteínas efrinas expresadas en la porción posterior de cada esclerotoma parecen impedir la migración celular de la cresta neural.
8. Algunas células de la cresta neural parecen ser capaces de formar un gran repertorio de tipos celulares. Otras células de la cresta neural pueden comprometerse a un destino aún antes de migrar. El destino final de la célula de la cresta neural puede a veces cambiar su especificación.
9. Los destinos de las células de la cresta neural craneal están en una gran extensión controlados por los genes Hox. Ellas pueden adquirir su patrón de expresión del gen Hox a través de la interacción con las células vecinas.
10. El diente se desarrolla mediante un elaborado diálogo entre el mesénquima derivado de la cresta neural y el epitelio de la mandíbula. El mesénquima se convierte en los odontoblastos, mientras que el epitelio genera los ameloblastos.
11. El principal centro señalizador de los dientes es el nudo del esmalte. Éste secreta varios factores paracrinos que regulan la proliferación y diferenciación celulares en el mesénquima y el epitelio.
12. Las neuronas motoras son especificadas de acuerdo a su posición en el tubo neural. Los factores de transcripción de la familia LIM juegan un importante papel en esta especificación.
13. Los blancos de las neuronas motoras son especificados antes de que sus axones se extiendan hacia la periferia.
14. El cono de crecimiento es la organela locomotora de la neurona y detecta las señales ambientales.
15. Los axones pueden encontrar sus blancos sin actividad neuronal.
16. Algunas proteínas son generalmente permisivas para la adhesión neuronal y proporcionan sustratos sobre los cuales los axones pueden migrar. Otras sustancias impiden su migración.
17. Algunos conos de crecimiento reconocen moléculas que están presentes en áreas muy específicas y por esta razón son guiadas por estas moléculas hacia sus blancos respectivos.
18. Algunas neuronas son "mantenidas en línea" por moléculas repulsivas. Si se alejan del camino hacia sus blancos, estas moléculas las envían a ellas de regreso. Algunas moléculas, como las semaforinas, son selectivamente repulsivas para un grupo particular de neuronas.
19. Algunas neuronas detectan gradientes de una proteína y son atraídas hacia su blanco al seguir estos gradientes. Las netrinas pueden funcionar de este modo.
20. La selección del blanco puede ser producida por las neurotrofinas, proteínas que son producidas por el tejido blanco que estimula al grupo particular de axones que pueden inervarlo. En algunos casos, este blanco produce solo suficientes factores para apoyar a un solo axón.
21. La selección dirigida es actividad dependiente. Una neurona activa puede suprimir la formación de sinapsis por otras neuronas sobre el mismo blanco.
22. Las células ganglionares de la retina en ranas y pollos envían axones que se unen a regiones específicas del tectum óptico. Este proceso está mediado por numerosas interacciones y la selección del blanco parece ser mediada a través de las efrinas.
23. Algunas conductas parecen ser innatas ("integradas"), mientras que otras son aprendidas. La experiencia puede reforzar ciertas conexiones neurales.

Bibliografía citada

Ackerman, S. L., L. P. Kozak, S. A. Przyborski, L. A. Rund, B. B. Boyer and B. B. Knowles. 1997. The rostral malformation gene encodes an UNC-5 protein. Nature 386:838-842.

Akers, R. M., D. F. Mosher and J. E. Lilien. 1981. Promotion of retinal neurite outgrowth by substratum-bound fibronectin. Dev. Biol. 86:179-188.

Akitaya, T. and M. Bronner-Fraser. 1992. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. Dev. Dynam. 194:12-20.

Anderson, D. J. and R. Axel. 1986. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. Cell 47:1079-1090.

Baier, H. and F. BonhoeffeL 1992. Axon guidance by gradients of a target-derived component. Science 255:472-475.

Baker, C. V. and M. Bronner-Fraser M. 1997. The origins of the neural crest. II: An evolution- ar,v perspective. Mech. Dev. 69:13-29.

Baker, C. V. and M. Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes. 1. Embryonic induction. Dev. Biol. 232:1-61.

Baker, C. V., M. Bronner-Fraser, N. M. Le Douarin and M. A. Teillet.1997. Early- and latemigrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential in vivo. Development 124:3077-3087.

Barinaga, M. 1995. Receptors find work as guides. Science 269:1668-1670.

Baynash, A. G., K. Hosoda, A. Giaid, J. A. Richardson, N. Emoto, R. E. Hammer and M. Yanagisawa. 1994. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor

Capítulo 14 Mesodermo paraxial e intermedio

Canto a la fisiología de pies a cabeza, ni la fisonomía sola, ni el cerebro solo, son dignos de la Musa, digo que la forma completa es mucho más loable, a la Hembra en igualdad con el Macho yo canto.

WALT WHITMAN (1867)

Olvídese del gran corazón humano y del cerebro, los ojos que ven vistas arrebatadoras, los labios que declaran, "soy." La cosa verdadera que está parada entre nosotros y el lodo primordial es el esqueleto humano. Construido de 206 huesos, el esqueleto es una catedral viva de bóvedas de marfil, costillas y contrafuertes; una estructura una vez iluminada y fuerte.

NATALIE ANGIER (1994)

EN LOS CAPÍTULOS 12 Y 13 se siguió el desarrollo de varios tejidos formados por el ectodermo de los vertebrados. En este capítulo y en el siguiente, se abordará el desarrollo de las capas germinativas mesodérmica y endodérmica. Se verá que el endodermo forma el revestimiento del tubo digestivo y de los tubos respiratorios, con sus órganos asociados. El mesodermo genera todos los órganos entre la pared del ectodermo y los tejidos endodérmicos.

El **mesodermo del tronco** del embrión en el estadio de néurula puede ser subdividido en cuatro regiones (fig. 14-1). Se piensa que estas subdivisiones son especificadas a lo largo del eje mediolateral (del centro hacia el lateral) mediante el incremento de las cantidades de las BMP (Pourquié y col. 1996; Tonegawa y col. 1997). El mesodermo más lateral del embrión de pollo expresa niveles más altos de BMP4 que las áreas de la línea media y se puede cambiar la identidad del tejido mesodérmico mediante la alteración de la expresión de BMP.

1. La primera región del mesodermo del tronco es el **cordamesodermo**. Este tejido forma la notocorda, un órgano transitorio cuyas principales funciones incluyen la inducción de la formación del tubo neural y el establecimiento del eje corporal anteroposterior. La formación de la notocorda sobre el futuro lado dorsal del embrión fue discutida en los capítulos 10 y 11.
2. La segunda región es el **mesodermo paraxial** o **mesodermo dorsal somítico**. El término *dorsal* se refiere al hecho de que los tejidos que se desarrollan desde esta región estarán localizados en el dorso del embrión, a lo largo de la columna vertebral. Las células en esta región forman **somitas**, bloques de células mesodérmicas a ambos lados del tubo neural, que producirán muchos de los tejidos conectivos del dorso (hueso, músculo, cartílago y dermis).
3. El **mesodermo intermedio** forma el sistema urogenital.
4. Más alejada de la notocorda la **lámina o placa del mesodermo lateral*** da origen al corazón, vasos sanguíneos y células sanguíneas del sistema circulatorio, como también al revestimiento de las cavidades corporales y a todos los componentes de las extremidades excepto los músculos. Ésta también forma una serie de membranas extraembrionarias que son importantes para el transporte de nutrientes hacia el embrión.

* *Nota del traductor:* el término lámina o placa del mesodermo lateral (*lateral plate mesoderm*) puede aparecer en otros textos de habla hispana como placa lateral del mesodermo. En este caso, se prefiere la denominación de lámina del mesodermo lateral para darle continuidad evidente a la idea de un mesodermo dividido en regiones desde el centro a la periferia y de este modo, también respetar los orígenes de la denominación clásica de mesodermos axial, paraxial, intermedio y lateral. Además, el mesodermo lateral posteriormente se deslamina (y pierde su condición original de lámina o placa) por lo tanto, es más adecuado conservar la jerarquía de mesodermo lateral.

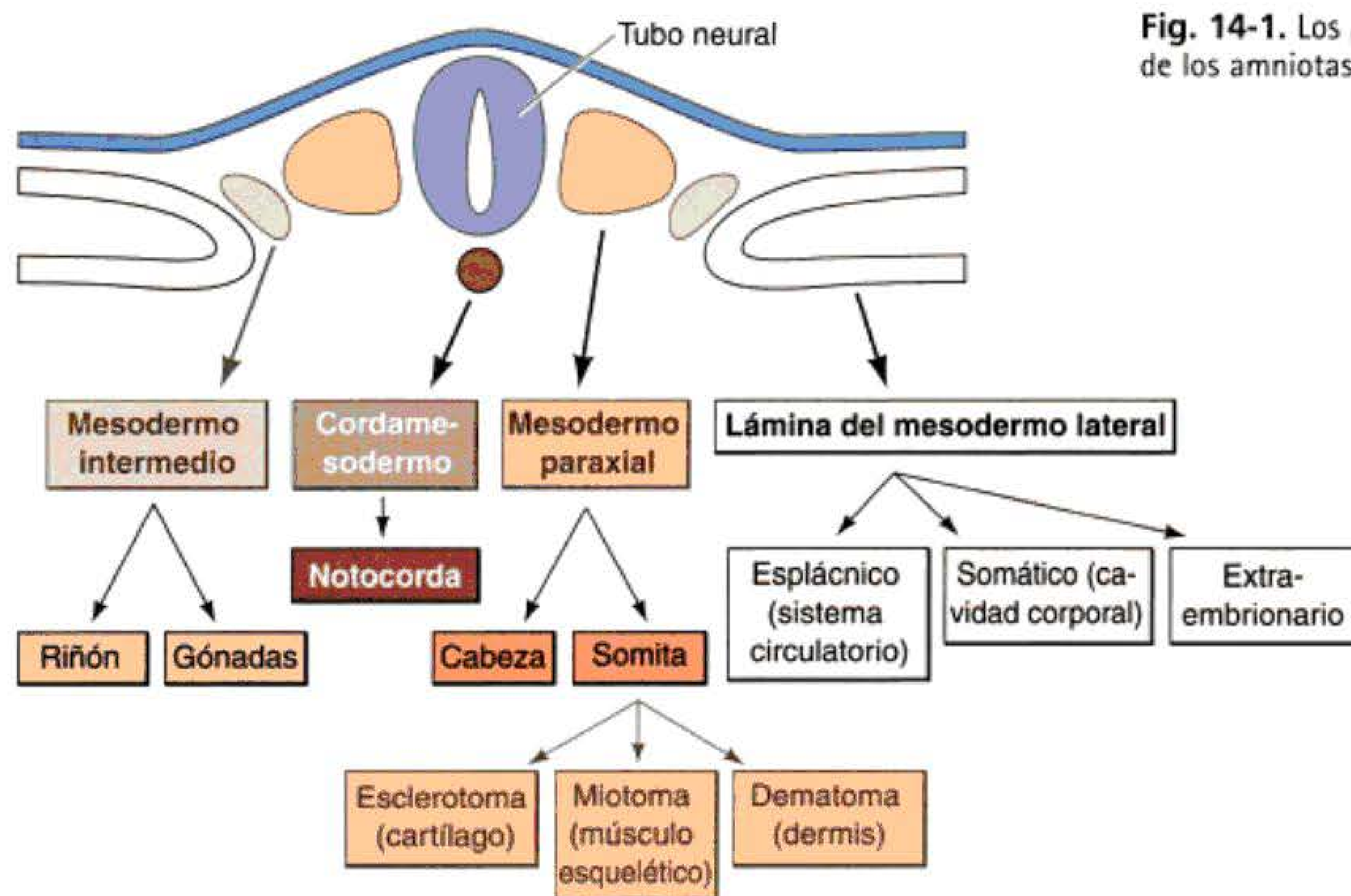


Fig. 14-1. Los principales linajes del mesodermo de los amniotas.

En una posición anterior al mesodermo del tronco se encuentra una quinta región mesodérmica, el **mesodermo de la placa precordal**. Esta región proporciona el mesénquima de la cabeza que forma la mayor parte de los tejidos conectivos y la musculatura de la cara.

MESODERMO PARAXIAL: LOS SOMITAS Y SUS DERIVADOS

Una de las principales tareas de la gastrulación es crear una capa mesodérmica entre el endodermo y el ectodermo. Como se muestra en la figura 14-2, la formación de los tejidos mesodérmico y endodérmico no es posterior a la formación del tubo neural, sino que se produce sincrónicamente. La notocorda se extiende por debajo del tubo neural desde la base de la cabeza hacia la cola. A cada lado del tubo neural se localizan gruesas bandas de células mesodérmicas. Estas bandas de mesodermo paraxial son referidas como la **placa segmentaria** o el **mesodermo no segmentado**. A medida que se produce la regresión de la línea primitiva y los pliegues del tubo neural comienzan a reunirse en el centro del embrión, el mesodermo paraxial se separa en bloques de células denominados somitas. El mesodermo paraxial parece ser especificado mediante el antagonismo de la señal de BMP por la proteína Nogina. Nogina es sintetizada, en general, por el mesodermo temprano de la placa segmentaria y si las células que expresan Nogina son colocadas en la lámina del mesodermo lateral presuntivo, el tejido de la lámina lateral será reespecificado hacia mesodermo paraxial formador de somitas (fig. 14-3; Tonegawa y Takahashi 1998).

Aunque los somitas son estructuras transitorias, son extremadamente importantes en la organización del patrón segmentario de los embriones de vertebrados. Como se vio en el capítulo anterior, los somitas determinan las rutas migratorias de las células de la cresta neural y de los axones de los nervios espinales. Los somitas dan origen a las células que forman las vértebras y las costillas, la dermis de la piel dorsal, los músculos esqueléticos del dorso (espalda) y los músculos esqueléticos de la pared corporal y de los miembros.

VADE MECUM[2] **Mesodermo en el embrión de vertebrado (Mesoderm in the vertebrate embryo).** La organización del mesodermo en el estadio de néurula es similar para todos los vertebrados. Se puede ver esta organización mediante la observación de secciones seriadas del embrión de pollo. **[Hacer clic sobre Chick-Mid]**

La formación de los somitas

La periodicidad de la formación del somita

Los componentes importantes de la somitogénesis (formación de somita) son: la periodicidad, la epitelización, la especificación y la diferenciación. El primer somita aparece en la porción anterior del tronco y nuevos somitas "brotan" desde el extremo rostral del mesodermo paraxial a intervalos regulares (fig. 14-4). La formación de somitas comienza a medida que las células del mesodermo paraxial se organizan en espirales de células denominados **somitómeros**. Los somitómeros se compactan y se agrupan mediante la formación de un epitelio y finalmente se separan del mesodermo paraxial presomítco para formar somitas individuales. Debido a que los embriones individuales pueden desarrollarse a velocidades levemente diferentes (como cuando los embriones de pollo son incubados a temperaturas levemente diferentes), el número de somitas presente es generalmente el mejor indicador de cuánto ha avanzado el desarrollo. El número total de somitas formados es característico de una especie (50 en pollos, 65 en ratones, y tanto como 500 en algunas víboras).

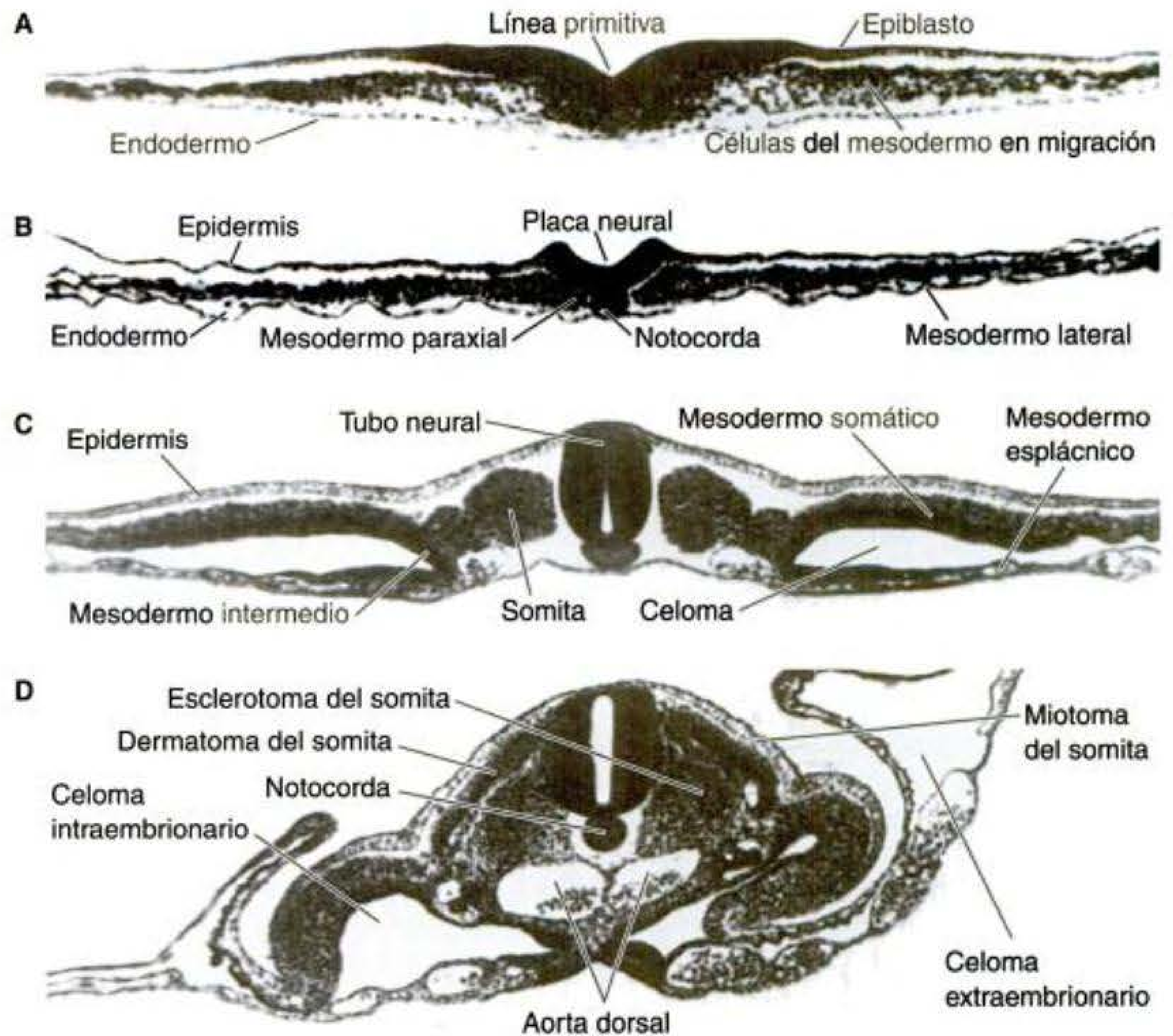


Fig. 14-2. Gastrulación y neurulación en el embrión de pollo, focalizada sobre el componente mesodérmico. (A) Región de la línea primitiva, que muestra la migración de los precursores mesodérmicos y endodérmicos. (B) Formación de la notocorda y del mesodermo paraxial. (C, D) Diferenciación de los somitas, del celoma y de las dos aortas (que finalmente se fusionarán). A-C, embriones de 24 horas; D, embrión de 48 horas.

Aunque el mecanismo que controla la periodicidad de la formación del somita no se entiende completamente, uno de los agentes clave en este proceso es la vía de señalización Notch. Cuando un grupo pequeño de células de una región que está formando un límite del somita presuntivo es trasplantada hacia la región de mesodermo no segmentado que normalmente no sería parte del área limítrofe, se crea un nuevo límite. Las células limítrofes trasplantadas instruyen a las células anteriores a ellas a epitelializarse y separarse. Además, las células no limítrofes pueden adquirir capacidad para formar límite si una proteína Notch activada o Lunatic fringe, una proteína que activa a Notch, es electroporada en aquellas células (fig. 14-5A-C, Sato y col. 2002).

Estas células del límite establecen *dónde* se forma el borde, pero su información no dice *cuándo* se forma el borde. Se ha propuesto (Dale y col. 2003) que una de las proteínas activadas por Notch es también capaz de inhibir a Notch, estableciendo de este modo un asa de retroalimentación negativa. Cuando este inhibidor es degradado, Notch se vuelve activo nuevamente. Tal ciclo crearía un "reloj" por medio del cual Notch sería encendido y apagado por una proteína que induce él mismo. Estas oscilaciones de apagado y encendido podrían proporcionar las bases moleculares para la periodicidad de la segmentación del somita.

Se ha demostrado que las mutaciones que afectan la señalización de Notch son responsables de la formación vertebral anómala en ratones y humanos. En humanos, los individuos con displasia espondilocostal tienen numerosos defectos de vértebras y costillas que han sido relacionados con mutaciones del gen *parecido a Delta 3* (*Delta-like3*), que codifica un ligando para Notch. Los

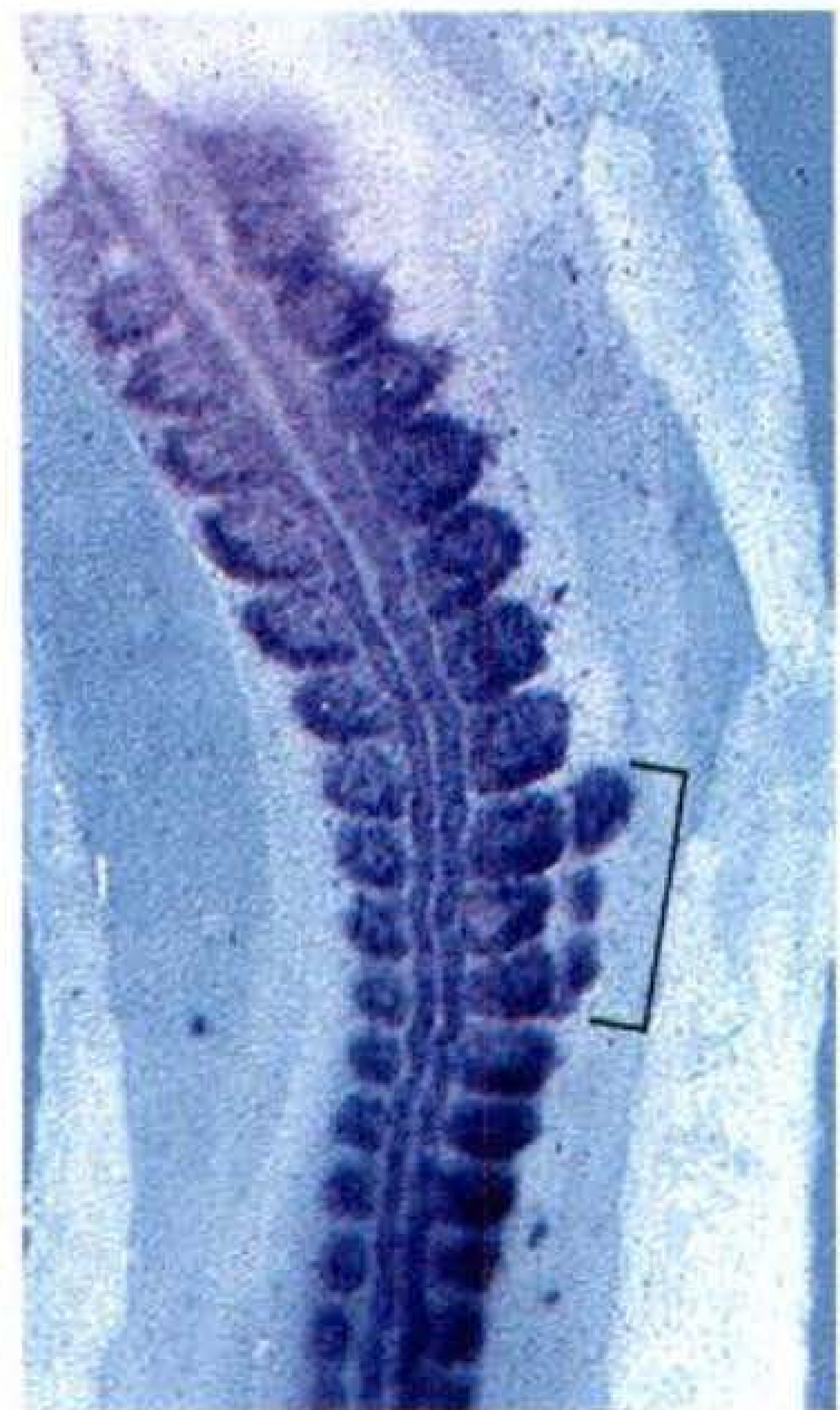


Fig. 14-3. Especificación de los somitas. Colocando células secretoras de Nogina en una región prospectiva de la lámina del mesodermo lateral del pollo se reespecificará el mesodermo hacia mesodermo paraxial formador de somita. Los somitas inducidos (entre paréntesis) fueron detectados mediante hibridación in situ con *Pax3*. (Según Tonegawa y Takahashi 1998; fotografía cortesía de Y. Takahashi.)

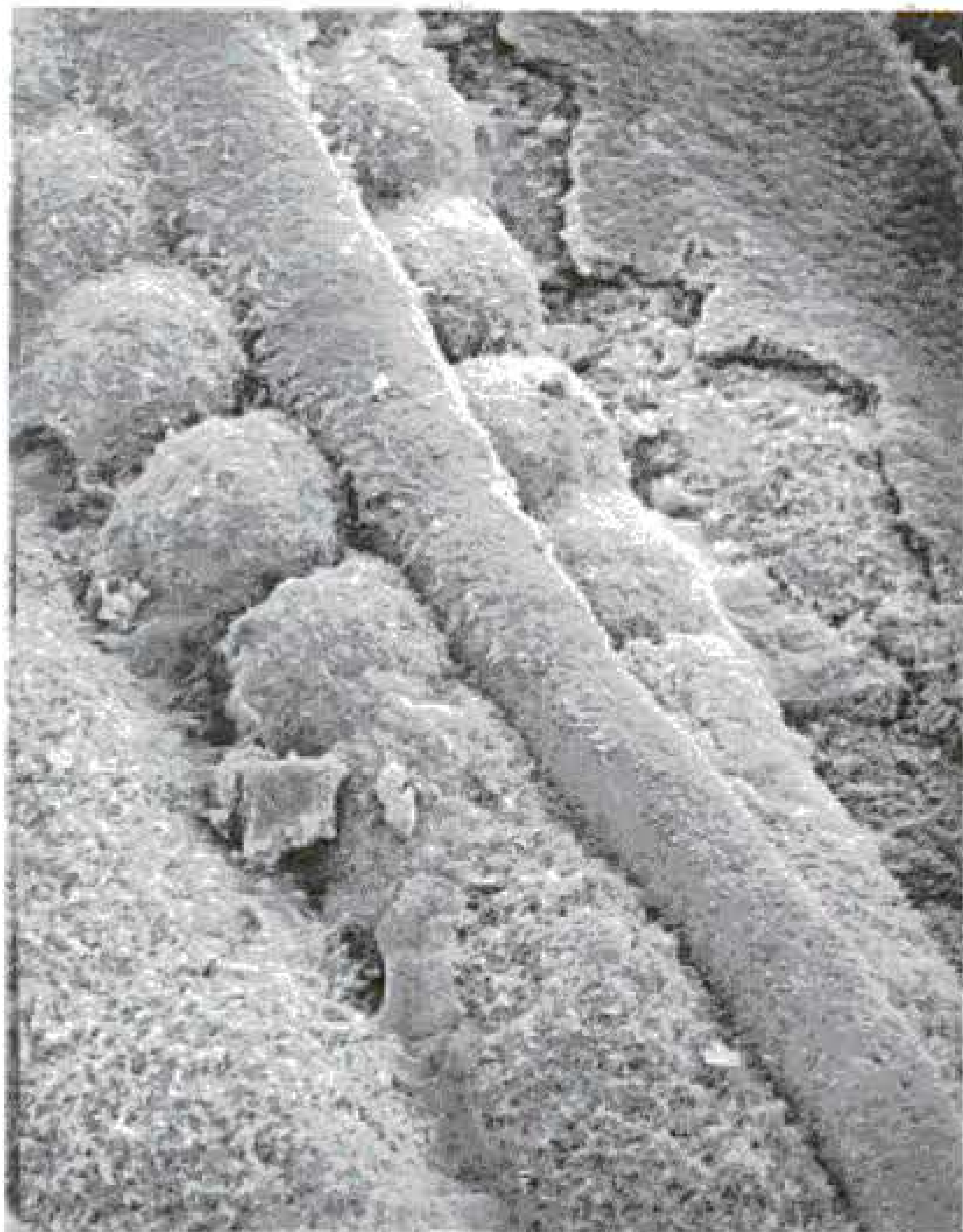


Fig. 14-4. Tubo neural y somitas vistos mediante microscopia electrónica de barrido. Cuando se quita el ectodermo superficial, se dejan ver los somitas bien formados, así como el mesodermo paraxial (inferior derecha) que todavía no se ha separado en distintos somitas. En la parte inferior izquierda se puede ver un redondeamiento del mesodermo paraxial hacia somitómero y pueden verse las células de la cresta neural que migran centralmente desde el techo del tubo neural. (Microfotografía cortesía de K. W. Tosney.)

ratones con knockout de este gen tienen un fenotipo similar al del síndrome humano (fig. 14-5D,E; Bulman y col. 2000; Dunwoodie y col. 2002).

Durante mucho tiempo se ha observado que la somitogénesis se produce simultáneamente con la regresión de la línea primitiva. Investigaciones recientes (Dubrulle y col. 2001; Sawada y col. 2001) sugieren que esto no es simplemente una coincidencia y que el nódulo de Hensen regula el ritmo de la somitogénesis al regular la expresión de Lunatic fringe. A medida que las células pasan a través del nódulo de Hensen, secretan FGF8. Este factor paracrino puede impedir que las células expresen Lunatic Fringe. A medida que se produce la regresión del nódulo, las células del nódulo que secretan FGF8 se mueven más hacia posterior, permitiéndoles a las células mesodérmicas paraxiales que han estado bajo el dominio de influencia de FGF8 hacerse anteriores a aquella zona. Estas células mesodérmicas paraxiales ahora son capaces de convertirse en somitas.

La separación de los somitas desde el mesodermo no segmentado

Si la señal de Notch determina el lugar de formación del somita, entonces Notch debe controlar una cascada de expresión génica que finalmente separa los tejidos. Estos genes son expresados de un modo cíclico y funcionan como un "reloj" de segmentación autónoma (Palmeirim y col. 1997; Jouve y col. 2000, 2002; véase además el capítulo 5). Uno de estos genes es *Hairy1*, un homólogo del gen de segmentación de *Drosophila*, que codifica un factor de transcripción.

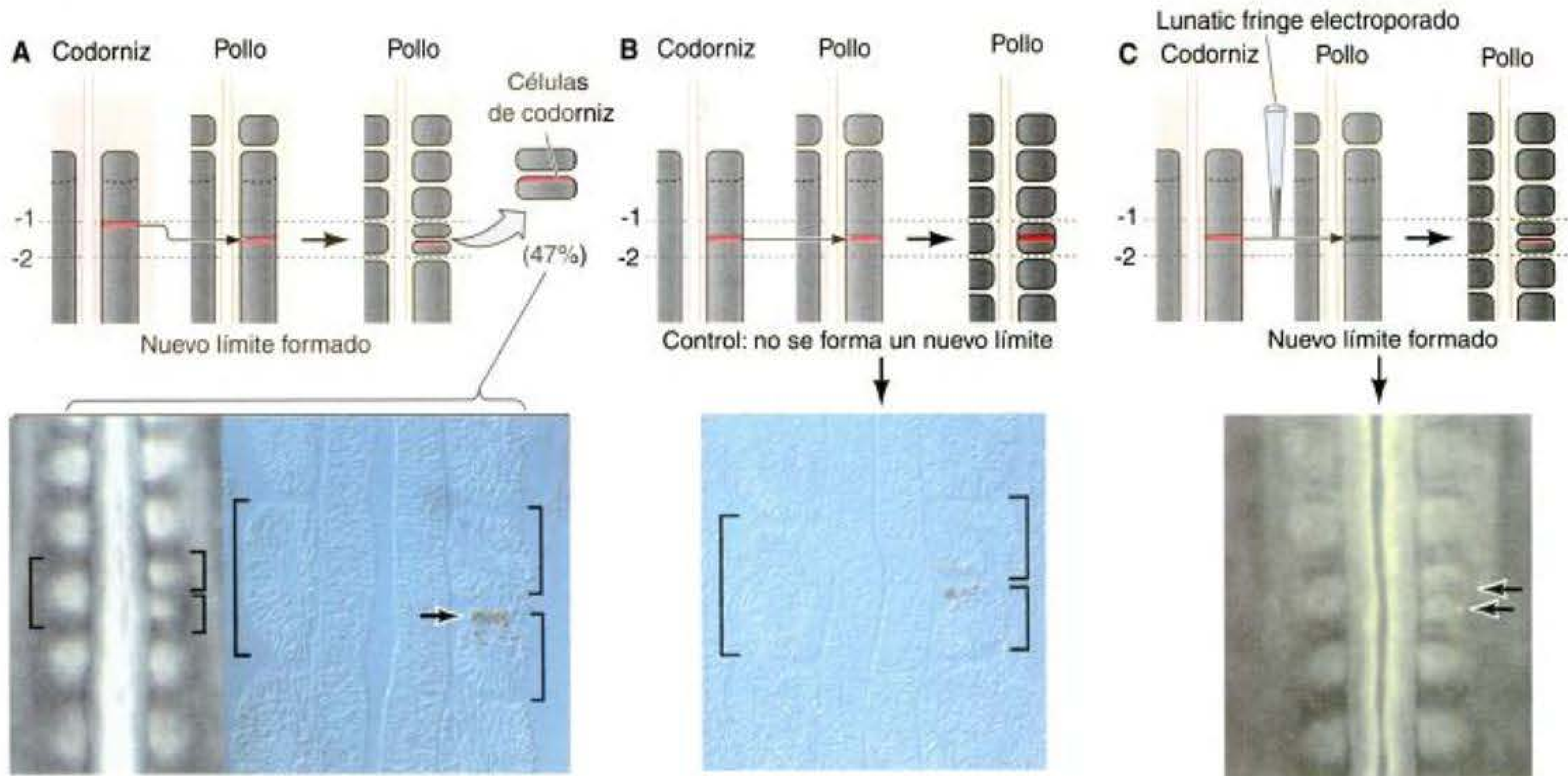
Como otros genes regulados por la vía de señalización de Notch, el gen *Hairy1* es expresado de un modo dinámico. En primer lugar, es expresado en la porción caudal de cada somita y persiste en estas regiones caudales por al menos 15 horas. En segundo lugar, es expresado en la placa segmentaria presomítica de una manera cíclica y parecida a una onda, alcanzando la cúspide cada 90 minutos. Esta expresión es detectada primero en la región más caudal del mesodermo presomítico; esta región de expresión se mueve hacia anterior a medida que se forma cada somita. Por último, como una ola que deja sus conchas sobre la playa, esta expresión se desvanece caudalmente, y deja una delgada banda de expresión en su alcance más anterior. La región más caudal de esta banda de expresión anterior se correlaciona con el terminal posterior del siguiente somita a ser formado. Este proceso puede observarse en la figura 14-6.

El gen *Hairy1* codifica un factor de transcripción, pero se desconocen cuáles son sus blancos de interés. Los posibles blancos (directos o indirectos) son los genes para la efrina y su receptor. Se mencionó en el capítulo 13 que las proteínas del receptor Eph tirosinacinasa y sus ligandos efrinas son capaces de provocar la repulsión célula-célula entre el somita posterior y las células de la cresta neural en migración. Efrina y Eph también pueden ser críticas para la separación de los somitas. En el pez cebra y en el pollo, el límite entre el somita separado más recientemente y el mesodermo presomítico se forma entre la efrina B2 en la parte posterior del somita y EphA4 en la porción más anterior del mesodermo presomítico (fig. 14-7; Durbin y col. 1998). A medida que se forman los somitas, este patrón de expresión génica se repite caudalmente. La interferencia de esta señal (mediante la inyección de los embriones con RNA que codifica Eph dominantes negativas) lleva a la formación de un límite anormal del somita. Se piensa que la señal de Eph actúa de mediadora de los cambios de la forma celular y que tales cambios podrían ser responsables de la separación del mesodermo presomítico en el borde efrina B2/EphA4.

Aunque la señal efrina-Eph puede ser responsable de convertir el patrón previamente establecido por la proteína Hairy1 en el mesodermo presomítico en el verdadero somita, se desconoce el mecanismo por el cual esto es llevado a cabo. Los límites de los somitas no siguen exactamente el patrón EphA4, y es posible que la función de EphA4 pueda ser importante después de que el somita ha comenzado a separarse de la placa segmentaria (Kulesa y Fraser 2002).

La epitelización del somita

Varios estudios en el pollo han demostrado que la transformación de cada somita desde tejido mesenquimático a un bloque epitelial se produce aún antes de la separación del somita. Como se observa en la figura 14-4, las células del somitómero están organizadas al azar como una masa mesenquimática. La síntesis de dos proteínas de la matriz extracelular, fibronectina y cadherina-N, las une en los bloques de tejido que formarán uniones estrechas y generarán su propia lámina basal (fig. 14-8A, B; Ostrovsky y col. 1984; Lash y Yamada 1986; Hatta y col. 1987). Estas proteínas de la matriz extracelular, a su vez,



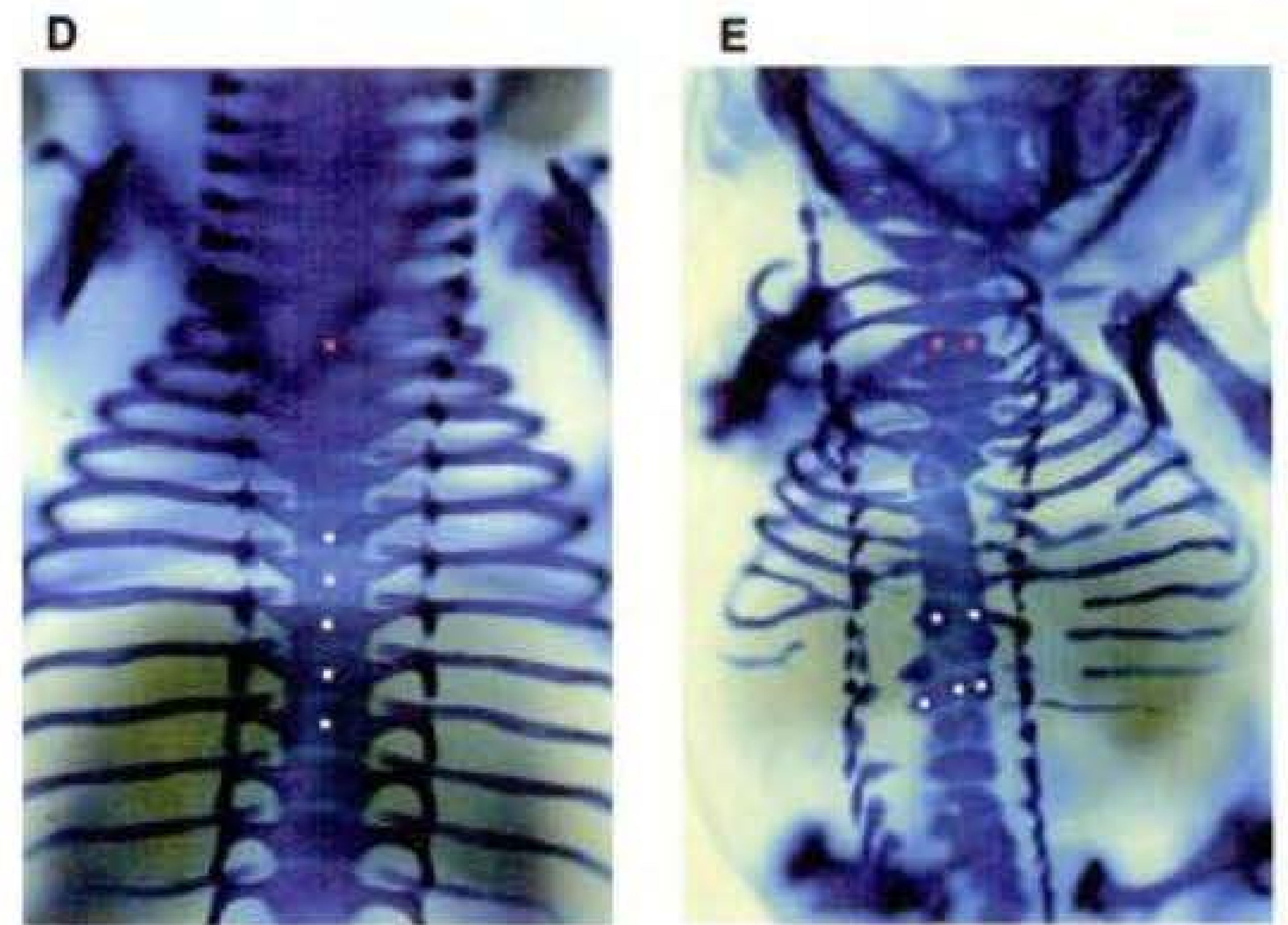


Fig. 14-5. La señal de Notch y la formación del somita. **A.** El trasplante de una región limítrofe de somita prospectivo hacia una región no limítrofe crea un nuevo límite y un nuevo somita. **B.** El trasplante de células no limítrofes hacia una región no limítrofe no genera un nuevo límite o un nuevo somita. **C.** Sin embargo, el agregado de la proteína Lunatic fringe a células no limítrofes las transforma en células que pueden producir límites y nuevos somitas cuando son trasplantadas hacia áreas no limítrofes. **D, E.** Vistas dorsales de **D**, un ratón control y **E**, una compañera de camada con una mutación en su gen *parecido a delta 3* (*Delta-like3*) (el gen que codifica un ligando de Notch). El mutante tenía varios centros de osificación (puntos blancos) en fila en lugar de tenerlos en una columna y sus costillas estaban malformadas. (**A-C**, según Sato y col. 2002, microfotografías cortesía de Y. Takahashi; **D, E**, de Dunwoodie y col. 2002, fotografías cortesía de S. Dunwoodie.)

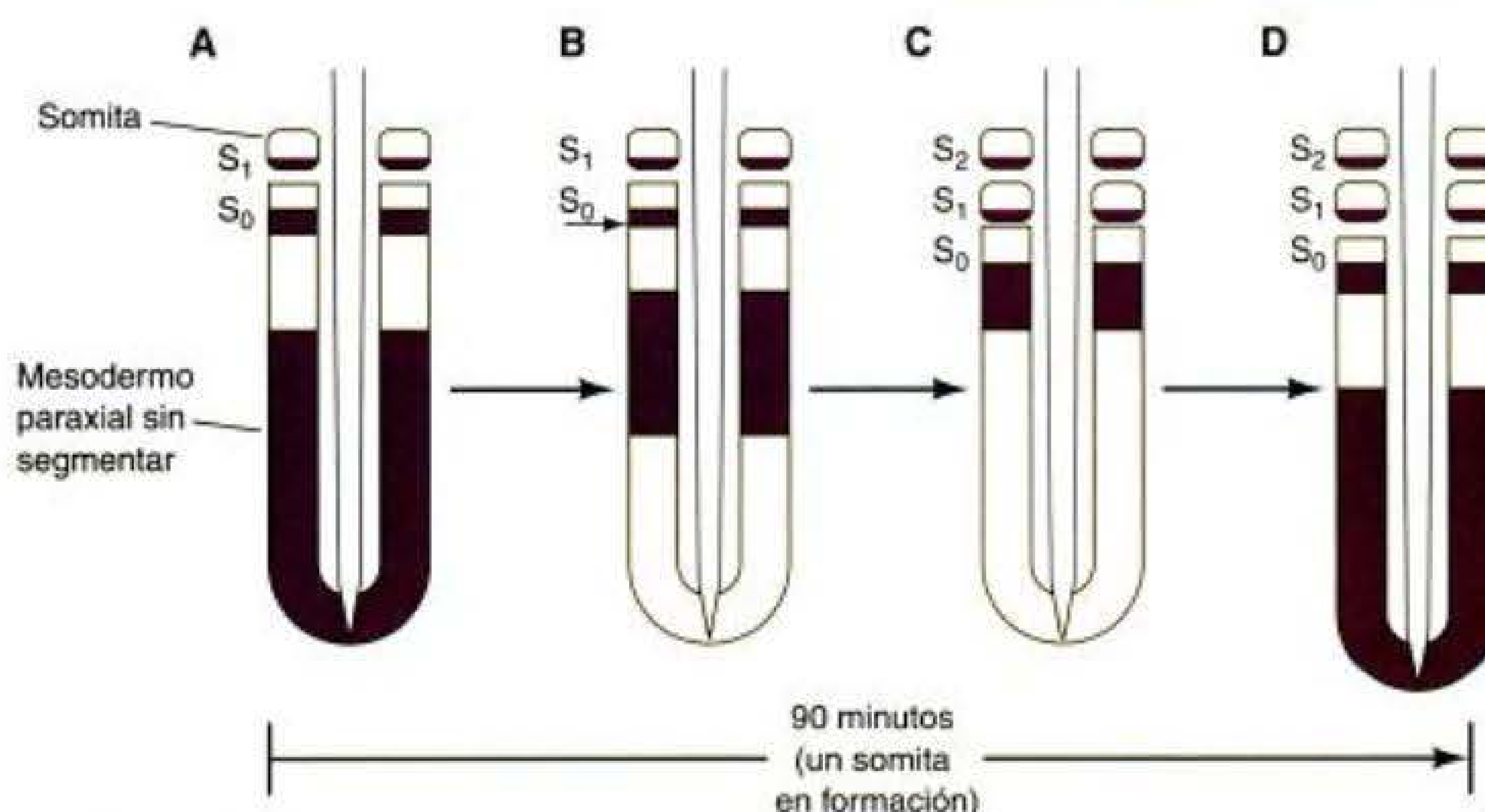


Fig. 14-6. La formación del somita se correlaciona con la expresión a modo de una onda del gen *Hairy1* en el pollo. **A.** Representación esquemática de la porción posterior de un somita de un embrión de pollo. S_1 ha brotado recién del mesodermo presomítico. La expresión del gen *hairy1* (violeta) se observa en la mitad caudal de este somita, así como en la porción posterior del mesodermo presomítico y en una delgada banda que formará la mitad caudal del siguiente somita (S_0). **B.** Una fisura caudal (flecha pequeña) comienza a separar el nuevo somita del mesodermo presomítico. La región posterior de expresión de *hairy1* se extiende hacia anterior. **C.** El somita recién formado ahora es referido como S_1; éste conserva la expresión de *hairy1* en su mitad caudal, a medida que el dominio posterior de expresión de *hairy1* se mueve más lejos hacia anterior y se acorta. El somita S_1 anterior, ahora denominado S_2, experimenta la diferenciación. **D.** Se completa la formación del somita S_1 y la región anterior de lo que había sido el patrón de expresión posterior de *hairy1* es ahora el patrón de expresión anterior. Este llegará a ser el dominio caudal del siguiente somita. El proceso en su totalidad toma 90 minutos.

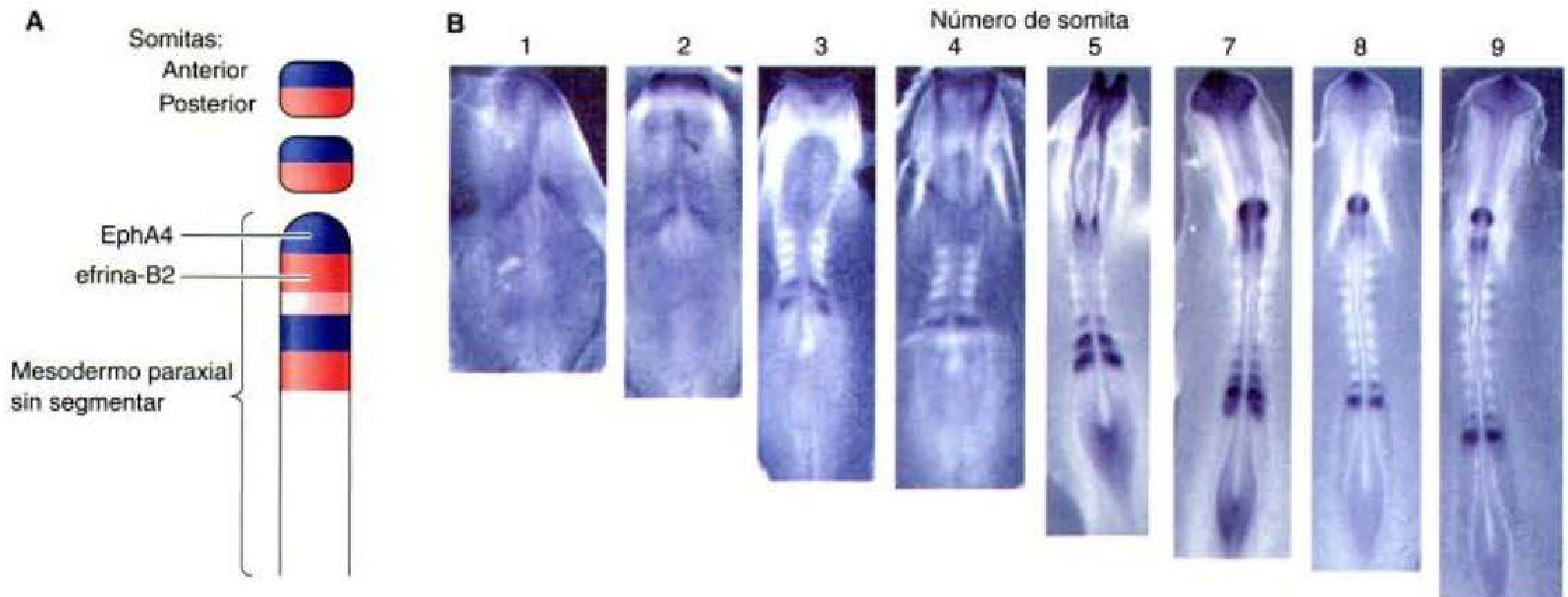


Fig. 14-7. Efrina y su receptor constituyen un posible sitio de corte para la formación del somita. **A.** Patrón de expresión del receptor de tirosinacinasa EphA4 (azul) y su ligando, efrina B2 (rojo) a medida que se desarrollan los somitas. El límite del somita se forma en la unión entre la región de expresión de efrina sobre la región posterior del último somita formado y la región de expresión de Eph sobre la parte anterior que formará al siguiente somita. En el mesodermo presomítico, el patrón es creado nuevamente cada vez que brota un somita. La región más posterior que formará el siguiente somita no expresa efrina hasta que el somita ya está separado. **B.** Hibridación in situ que muestra la expresión de EphA4 (azul oscuro) a medida que se forman nuevos somitas en el embrión de pollo. (A, según Durban y col. 1998; B, fotografía cortesía de J. Kastner.)

pueden ser reguladas por la expresión del gen *Paraxis*. Este gen codifica un factor de transcripción que también es expresado en el extremo rostral (anterior) del mesodermo no segmentado de los embriones de ratón y que es visto precisamente en la región que formará el somita (fig. 14-8C). En ratones deficientes de *Paraxis*, los somitas se segregan de la placa segmentaria, pero fracasan en la epitelización (Burgués y col. 1995; Barnes y col. 1997; Tajbakhsh y Spörle 1998).

Otra proteína importante involucrada en esta transición mesenquimática-epitelial es una pequeña GTPasa, Rac1. Rac1 puede ser activada por integrina cuando la integrina se une a la fibronectina, y Rac1 activada puede disparar cambios drásticos en el citoesqueleto (Kjoller y Hall 1999). Tales cambios citoesqueléticos son vistos en las células del somita a medida que ellas llevan a cabo la transición desde el estado mesenquimático al epitelial. Además, la electroporación de Rac1 mutada (pero no la de otras pequeñas GTPasas) en la placa segmentaria del pollo evita que los somitas adquieran las características epiteliales (Takahashi y col. 2002).

Especificación del somita a lo largo del eje anteroposterior

Aunque todos los somitas parecen idénticos, ellos formarán diferentes estructuras en distintas posiciones a lo largo del eje anteroposterior. Por ejemplo, las costillas son derivadas de los somitas. Los somitas que forman las vértebras cervicales del cuello y las vértebras lumbares del abdomen no son capaces de formar costillas; las costillas son generadas únicamente por los somitas que forman las vértebras torácicas. Además, la especificación de las vértebras torácicas se produce muy temprano en el desarrollo. Si se aísla la región de la placa segmentaria del pollo que dará origen a los somitas torácicos y se trasplanta este mesodermo hacia la región cervical (cuello) de un embrión más joven, el embrión huésped desarrollará costillas en su cuello –pero las costillas se formarán solamente sobre el lado donde el mesodermo torácico ha sido trasplantado (fig. 14-9; Kieny y col. 1972; Nowicki y Burke 2000).

Como se discutió en el capítulo 11 (véase fig. 11-46), los somitas son especificados de acuerdo con los genes Hox que ellos expresan. Ratones que son homocigotas para la mutación de pérdida de función de *Hoxc-8* convertirán una vértebra lumbar en un vértebra torácica extra, completa con costillas (véase fig. 11-44). Los genes Hox son activados concomitantemente con la formación del somita y el embrión parece "contar somitas" en el ajuste de la posición de los límites de expresión de los genes Hox. Si los niveles de FGF8 son manipulados para crear somitas adicionales (aunque más pequeños), el patrón de expresión de los genes Hox será activado más temprano. La expresión adecuada de los genes Hox será activada en el número apropiado de somita, aún si éste se encuentra en una posición diferente a lo largo del eje anteroposterior. Además, cuando las mutaciones afectan el reloj de segmentación autónoma, también afectan la activación de los genes Hox apropiados (Dubrulle y col. 2001; Zakany y col. 2001). Una vez establecido, cada somita conserva su patrón de expresión de genes Hox, incluso si es trasplantado hacia otra región del embrión (Nowicki y Burke 2000). La regulación de los genes Hox por el reloj de segmentación debería permitir la coordinación entre la formación y especificación de los nuevos segmentos.

Los derivados del somita

Los somitas forman 1) el cartílago de las vértebras y de las costillas; 2) los músculos de la caja torácica, de las extremidades de la pared abdominal, de la espalda y de la lengua y 3) la dermis de la piel dorsal. En contraste,

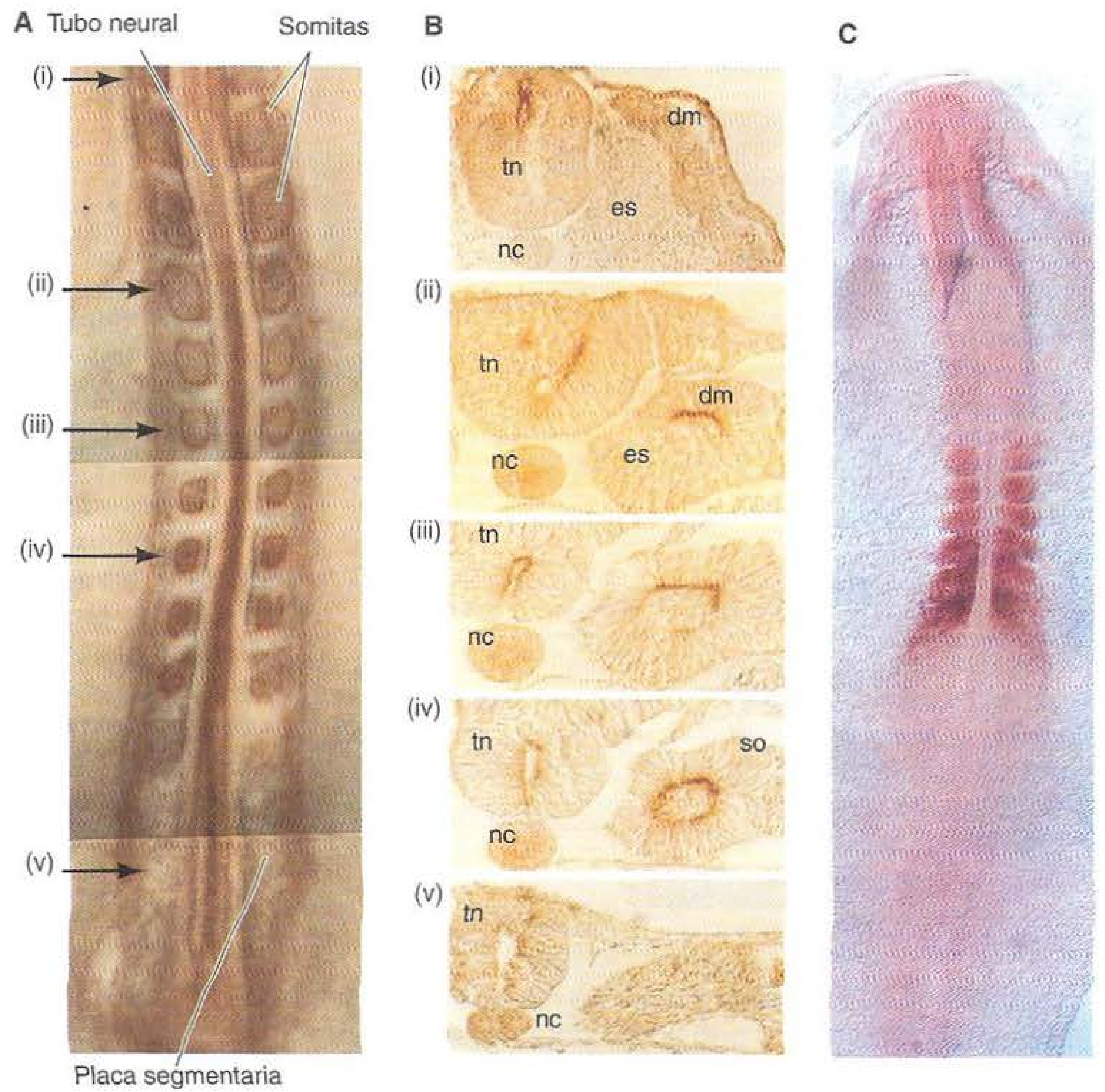


Fig. 14-8. Epitelización y pérdida de epitelización en los somitas de un embrión de pollo de 6 somitas. A, B. Distribución de cadherina-N en el embrión de pollo de 2 días durante la somitogénesis. A. Inmunohistoquímica de embriones enteros que utilizan un anticuerpo específico contra cadherina-N. B. Secciones de embriones enteros inmunoteñidos tomadas a idénticas posiciones a lo largo del eje embrionario indicado en A. (i) Un somita diferenciado con poca tinción de cadherina-N. (ii) Somitas con pérdida de epitelización y el surgimiento del esclerotoma (iii) Pérdida de epitelización temprana del somita con alguna pérdida de cadherina-N. (iv) El somita epitelizado muestra la cadherina-N que reviste el somitocele. (v) El mesodermo no segmentado de la placa segmentaria muestra escasa cadherina-N. La cadherina-N es detectada en el tubo neural durante la somitogénesis, con alguna regulación en menos en el somita en diferenciación. dm, dermamiotoma; nc, notocorda; tn, tubo *neural; es,* esclerotoma; so, somita; ps, placa segmentaria. En C, la hibridación *in situ revela la expresión del mRNA* Paraxis (rojo). Paraxis es visto en los somitas y en la región del mesodermo no segmentado que dará origen al siguiente somita. (C, de Barnes y col. 1997; fotografías cortesía de R. Tuan.)

del temprano compromiso del mesodermo a lo largo del eje anteroposterior, el compromiso de las células dentro de un somita hacia sus respectivos destinos se produce relativamente tarde, después de que el somita ya se ha formado. Cuando el somita se separa primero desde el mesodermo presomítico, cualquiera de sus células puede llegar a ser cualquiera de las estructuras derivadas del somita. Sin embargo, a medida que el somita madura, varias regiones llegan a comprometerse formando solo ciertos tipos celulares. Las células ventromediales del somita (aquellas células localizadas más alejadas del dorso pero próximas al tubo neural) experimentan mitosis, pierden sus características epiteliales redondeadas y se convierten en células mesenquimáticas nuevamente. La porción del somita que da origen a estas células se denomina el **esclerotoma** y estas células mesenquimáticas fi-

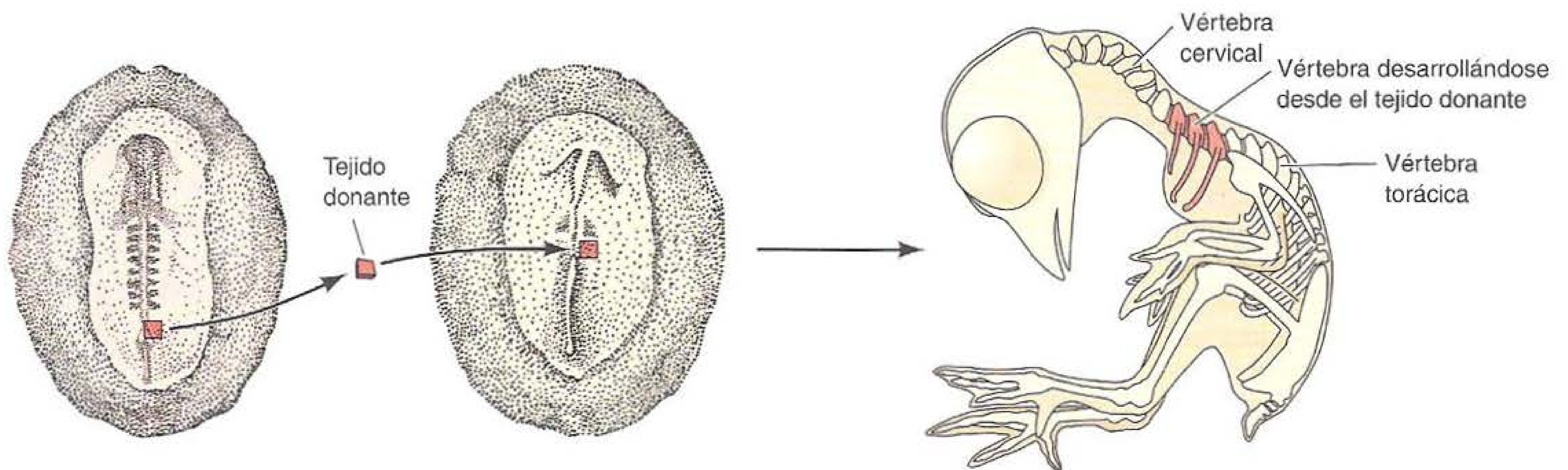


Fig. 14-9. El mesodermo de la placa segmentaria es determinado por su posición a lo largo del eje anteroposterior antes de la somitogénesis. Cuando el mesodermo de la placa segmentaria que debería formar normalmente somitas torácicos es trasplantado hacia una región en un embrión más joven (caudal al primer somita) que debería normalmente dar origen a los somitas cervicales (cuello), el mesodermo injertado se diferencia de acuerdo a su posición original y forma costillas en el cuello. (Según Kieny y col. 1972.)

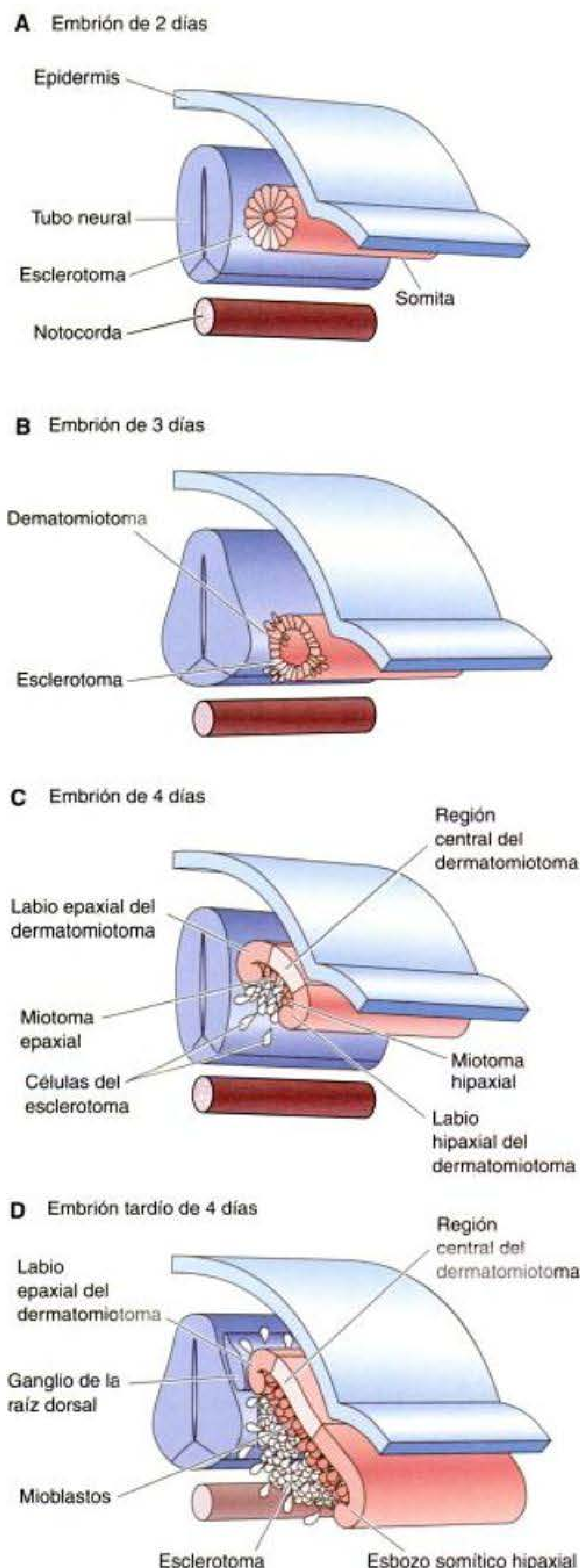


Fig. 14-10. Esquema de una sección transversal a través del tronco de un embrión de pollo de 2-4 días. **A.** En el somita de 2 días, las células del esclerotoma pueden distinguirse de las del resto del somita. **B.** En el día 3, las células del esclerotoma pierden sus adhesiones entre sí y migran hacia el tubo neural. **C.** En el día 4, las células restantes se dividen. Las células mediales forman un miotoma epaxial por debajo del dermatomiotoma, mientras que las células laterales forman un miotoma hipaxial. **D.** Una capa de precursores celulares musculares (el miotoma) se forma por debajo del dermatomiotoma epitelial. (A, B, según Langman 1981; C, D, según Ordahl 1993.)

nalmente se convierten en células cartilaginosas (condrocitos) de la vértebra y parte (si no toda) de cada costilla (fig. 14-10A,B; véase además fig. 14-2).

Los mapas de destino con quimeras pollo-codorniz (Ordahl y Le Douarin 1992; Brand-Saberi y col. 1996; Kato y Aoyama 1998) han revelado que la porción epitelial remanente del somita está organizada en tres regiones (fig. 14-10C, D). Las células en las dos porciones laterales del epitelio (aquellas regiones más cercanas y más alejadas del tubo neural) constituyen la región formadora de músculo, o **miotoma**. Las células del miotoma se dividen para producir la capa más inferior de células precursoras de músculo, los **mioblastos**. La estructura de doble capa resultante es denominada el **dermatomiotoma**. Aquellos mioblastos formados desde la región próxima al tubo neural forman los **músculos epaxiales** (los músculos profundos de la espalda), mientras que aquellos mioblastos formados en la región más alejada del tubo neural producen los **músculos hipaxiales** de la pared corporal, extremidades y lengua (véase fig. 14-11; véanse además Christ y Ordahl 1995; Venters y col. 1999). La región central de la capa dorsal del dermatomiotoma ha sido denominada clásicamente el **dermatoma** y genera el mesénquima del tejido conectivo de la piel de la espalda: la **dermis**. (La dermis de otras áreas del cuerpo se forma desde otras células mesenquimáticas, no lo hace desde los somitas.) El dermatoma no es físicamente distinto a las regiones laterales del miotoma hasta que las células de músculo presuntivo migran y se diferencian.

Determinación del esclerotoma y del dermatoma

Como una parte proverbial de bienes raíces, el destino de la región de un somita depende de tres cosas: localización, localización y localización.

La especificación del somita es llevada a cabo por la interacción de varios tejidos. La porción ventromedial del somita es inducida a convertirse en esclerotoma por factores paracrinos, especialmente Sonic hedgehog, secretado desde la notocorda y desde la placa del piso del tubo neural (Fan y Tessier-Lavigne 1994; Johnson y col. 1994). Si son trasplantadas porciones de la notocorda (u otra fuente de Sonic hedgehog) próximas a otras regiones del somita, aquellas regiones, también llegarán a ser células del esclerotoma. Las células del esclerotoma expresan un nuevo factor de transcripción, Pax1, que es requerido para su diferenciación hacia cartílago y cuya presencia es necesaria para la formación de la vértebra (fig. 14-11; Smith y Tuan 1996). Ellas también expresan I-mf, un inhibidor de los factores de transcripción de la familia miogénica bHLH que inician la formación de músculo (Chen y col. 1996). Parece ser que la notocorda induce a las células mesenquimáticas de su alrededor a secretar epimorfina y esta epimorfina atrae a las células del esclerotoma hacia la región alrededor de la notocorda y del tubo neural (Oka y col. 2002).

El dermatoma se diferencia en respuesta a dos factores secretados por el tubo neural: neurotrofina 3 (NT-3) y Wnt1. Los anticuerpos que bloquean las actividades de NT-3 evitan la conversión del dermatoma epitelial a mesénquima dérmico laxo que migra por debajo de la dermis (Brill y col. 1995). En aves, esta dermis derivada del somita es responsable de la inducción de plumas (véase

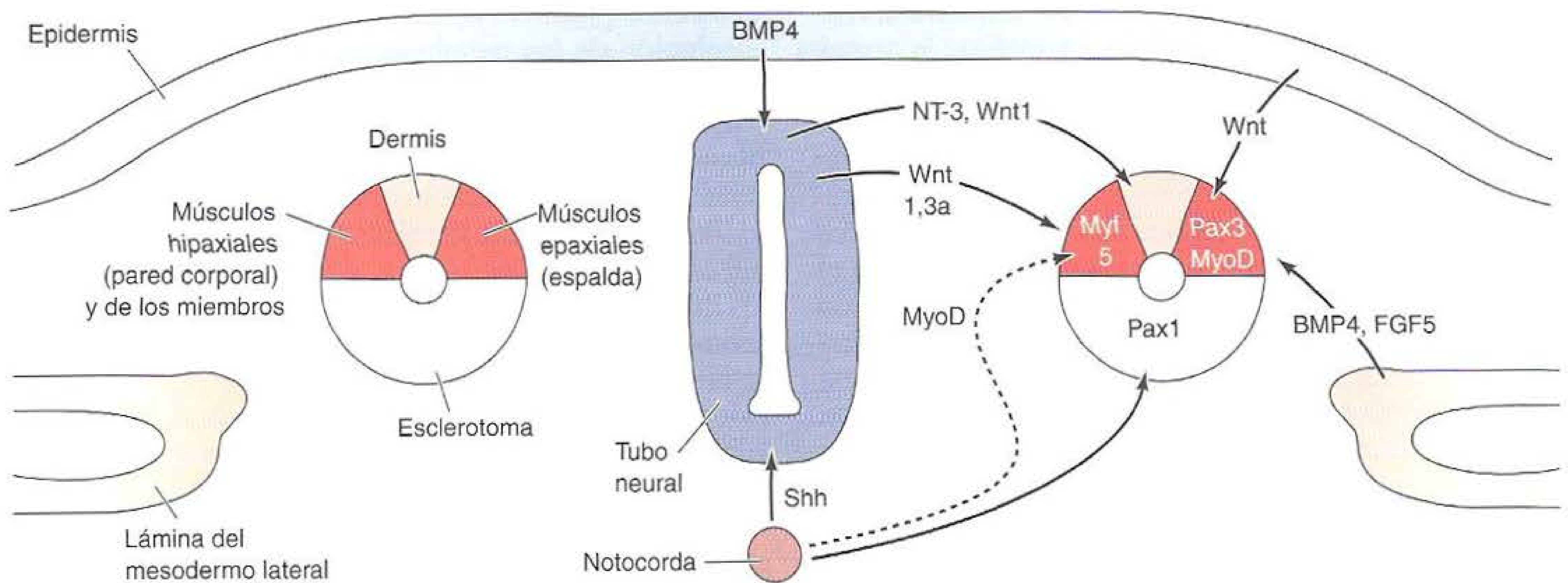


Fig. 14-11. Modelo de las principales interacciones postuladas en el establecimiento del patrón del somita. Una combinación de Wnt (probablemente Wnt1 y Wnt3a) es inducida por BMP4 en el tubo neural dorsal. Estas proteínas Wnt, en combinación con las bajas concentraciones de Sonic hedgehog desde la notocorda y desde la placa del piso, inducen el miotoma epaxial, que sintetiza el factor de transcripción miogénico Myf5. Las concentraciones elevadas de Sonic hedgehog inducen la expresión de Pax1 en las células destinadas a ser esclerotoma. Ciertas concentraciones de neurotrofina-3 (NT-3) desde el tubo neural dorsal parecen especificar al dermatoma, mientras que se piensa que las proteínas Wnt desde la epidermis, junto con BMP4 y FGF5 desde la lámina del mesodermo lateral inducen al miotoma hipaxial. (Según Cossu y col. 1996b.)

fig. 6-7) y la región dorsal del tubo neural es crítica para la especificación de esta dermis. Cuando se extirpa o se rota el tubo neural se impide que se forme esta dermis (Takahashi y col. 1992; Olivera-Martinez 2002).

Determinación del miotoma

De un modo similar, el miotoma es inducido por, al menos, dos señales distintas. Los estudios que involucran trasplantes y knockout de ratones indican que los mioblastos epaxiales que vienen desde la porción medial del somita son inducidos por factores desde el tubo neural, probablemente Wnt1 y Wnt3a desde la región dorsal y bajos niveles de Sonic hedgehog desde la región ventral (Münsterberg y col. 1995; Stern y col. 1995; Ikeya y Takada 1998). Los mioblastos hipaxiales que vienen desde el borde lateral del somita son especificados probablemente por una combinación de proteínas de Wnt desde la epidermis y de la proteína morfogenética del hueso 4 (BMP4) desde la lámina del mesodermo lateral (Cossu y col. 1996a; Pourquié y col. 1996; Dietrich y col. 1998). Estos factores (véase fig. 14-11) hacen que los mioblastos migren alejándose de la región dorsal y retrasando su diferenciación hasta que se encuentran en una posición más ventral.

Además de estas señales positivas, hay señales inhibitorias que impiden que una señal pueda afectar a un grupo inapropiado de células. Por ejemplo, Sonic Hedgehog no solo activa el desarrollo del esclerotoma y del miotoma, sino que también inhibe la señal de BMP4 desde la lámina del mesodermo lateral extendiéndose medialmente y ventralmente (evitando de este modo la conversión de esclerotoma en músculo) (Watanabe y col. 1998). De manera semejante, Nogina es producida por la porción más medial del dermatomiotoma y evita que BMP4 le dé a estas células las características migratorias del músculo hipaxial (Marcelle y col. 1997).

¿Y qué le sucede a la notocorda, esa estructura central de mesodermo? Después de que ésta ha proporcionado la integridad axial del embrión temprano y que ha inducido la formación del tubo neural dorsal, su mayor parte degenera por apoptosis. Esta apoptosis problamemente sea inducida por fuerzas mecánicas (Aszódi y col. 1998). Si las células del esclerotoma han formado un cuerpo vertebral, las células de la notocorda mueren. Sin embargo, entre las vértebras, las células notocordales forman parte de los discos intervertebrales, los núcleos pulposos. Éstos son los discos que "se deslizan o hernian" en ciertas lesiones de la espalda.

SITIO WEB 14.1 **Poner en duda la competencia del somita (Calling the competence of the somite into question).** Cuando se hizo el knockout del gen *tbx6* en ratones, los embriones obtenidos tenían tres tubos neurales en la parte posterior de sus cuerpos. Sin el gen *tbx6*, el tejido somítico responde a la notocorda y a las señales epidérmicas como si fuera ectodermo neural.

SITIO WEB 14.2 **Mesodermo paraxial craneal (Cranial paraxial mesoderm).** La mayor parte de la musculatura de la cabeza no viene de los somitas. En su lugar, ésta viene del mesodermo paraxial (placa precordal) craneal. Estas células se originan junto a ambos lados del cerebro y migran hacia sus respectivos destinos.

Miogénesis: el desarrollo del músculo

Especificación y diferenciación por las proteínas miogénicas bHLH

Como se ha visto, las células musculares vienen de dos linajes celulares en el somita. En ambos casos, los facto-

res paracrinos instruyen a las células del miotoma a convertirse en musculares al inducirlas a sintetizar la proteína **MyoD** (véase fig. 14-11; Maroto y col. 1997; Tajbakhsh y col. 1997; Pownall y col. 2002). El modo en que esto sucede difiere levemente entre los linajes hipaxial y epaxial, y entre las diferentes clases de vertebrados. En la porción lateral del dermatomiotoma de ratón, que forma los músculos hipaxiales, los factores desde el ambiente que lo rodea inducen al factor de transcripción Pax3. Ante la ausencia de otros factores de transcripción inhibitorios (como los encontrados en las células del esclerotoma), Pax3 luego activa al gen *myoD*. En la región medial del dermatomiotoma, que forma los músculos epaxiales, MyoD es inducido por la proteína Myf5. MyoD y Myf5 pertenecen a la familia de los factores de transcripción denominados las **proteínas miogénicas bHLH** (básica hélice-asa-hélice; del inglés, *basic helix-loop-helix*) (a veces también referidas como las **MRF**, factores reguladores miogénicos; del inglés, *myogenic regulatory factors*). Todas las proteínas de esta familia se unen a sitios semejantes sobre el DNA y activan a genes específicos de músculo. Por ejemplo, la proteína MyoD parece activar directamente al gen fosfocinasa creatina específico del músculo mediante su unión al DNA inmediatamente corriente arriba de éste (Lassar y col. 1989). También hay dos sitios de unión a MyoD sobre el DNA adyacente a los genes que codifican una subunidad del receptor de acetilcolina del músculo del pollo (Piette y col. 1990). MyoD también activa directamente a su propio gen. Por esta razón, una vez que el gen de *myoD* es activado, su producto proteico se une al DNA inmediatamente corriente arriba del gen *myoD* y mantiene a este gen activo.

Mientras que Pax3 es encontrado en varios tipos celulares, las proteínas miogénicas bHLH son específicas para las células musculares. Cualquier célula que produce un factor de transcripción miogénico bHLH como MyoD o Myf5 está comprometida a convertirse en célula muscular. La transfección de genes que codifican cualquiera de estas proteínas miogénicas en un amplio rango de células cultivadas las transforma en células musculares (Thayer y col. 1989; Weintraub y col. 1989).

SITIO WEB 14.3 **Las proteínas miogénicas bHLH y sus reguladores (Miogenic bHLH proteins and their regulators).** Debido a que la proteína MyoD y sus parientes son tan poderosas que pueden hacer cambiar casi cualquier tipo celular a célula muscular, la síntesis de esta proteína tiene que ser inhibida en numerosas etapas. Han sido hallados numerosos inhibidores de la expresión del gen de la familia MyoD y de la función de la proteína.

Fusión de la célula muscular

Las células del miotoma que producen proteínas miogénicas bHLH son los mioblastos –comprometidos a precursores celulares musculares. Los experimentos con ratones quiméricos y cultivos de mioblastos demostraron que estas células se alinean juntas y se fusionan para formar los **miotubos** multinucleados característicos del tejido muscular. Por lo tanto, el miotubo multinucleado es una célula producto de la unión de varios mioblastos y la disolución de las membranas celulares entre ellos (Konigsberg 1963; Mintz y Baker 1967).

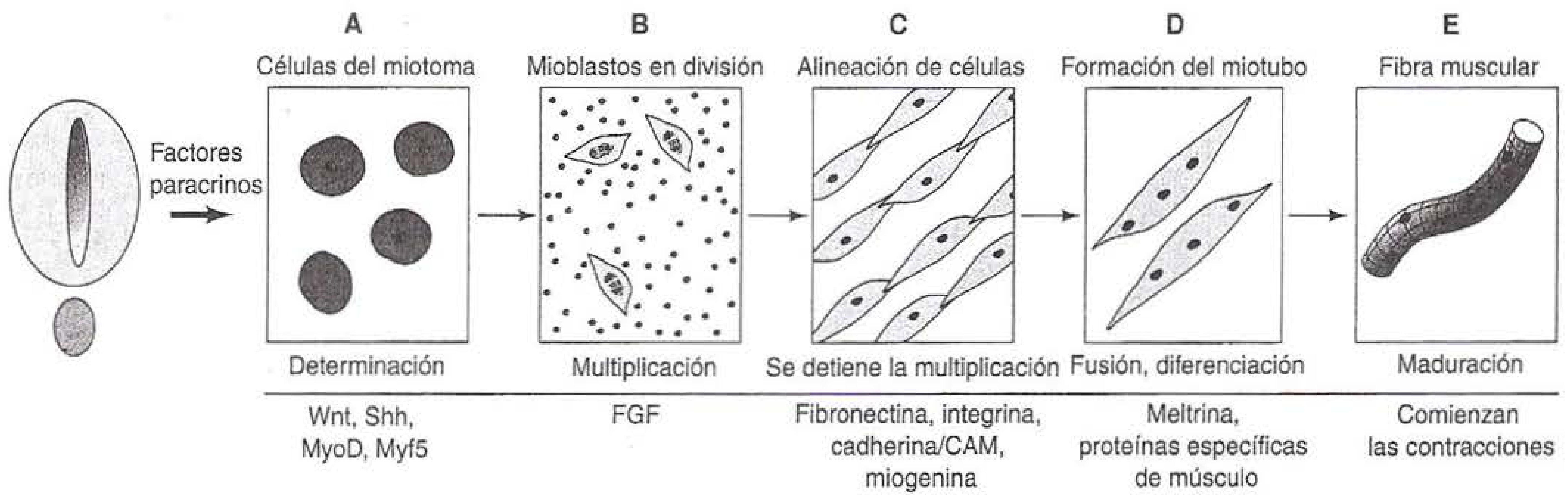
La fusión celular muscular comienza cuando los mioblastos dejan el ciclo celular. Mientras factores de crecimiento especiales (particularmente factores de crecimiento fibroblástico) están presentes, los mioblastos proliferarán sin diferenciarse. Cuando se agotan estos factores, los mioblastos detienen su división, secretan fibronectina sobre su matriz extracelular y se unen a ésta a través de la integrina $\alpha5\beta1$, su principal receptor de fibronectina (Menko y Boettiger 1987; Boettiger y col. 1995). Si esta adhesión es bloqueada de manera experimental, no resulta ningún músculo adicional; entonces, parece que la señal de adhesión integrina-fibronectina es crítica para instruir la diferenciación de los mioblastos hacia células musculares (fig. 14-12).

La segunda etapa es la alineación de los mioblastos en cadenas. Esta etapa está mediada por glucoproteínas de la membrana celular incluidas varias cadherinas y CAM (Knudsen 1985: Knudsen y col. 1990). El reconocimiento y alineamiento entre las células tiene lugar solamente si las células son mioblastos. La fusión puede producirse incluso entre los mioblastos del pollo y de la rata en cultivo (Yaffe y Feldman 1965); la identidad de las especies no es crítica.

La tercera etapa es el acontecimiento de fusión celular en sí mismo. Como en la mayoría de las fusiones, los iones calcio son críticos y la fusión puede activarse por ionóforos de calcio, como A23187, que transportan iones calcio a través de las membranas celulares (Shainberg y col. 1969; David y col. 1981). La fusión parece estar mediada por un grupo de metaloproteinasas denominadas **meltrinas**. Estas proteínas fueron descubiertas durante una búsqueda para proteínas de mioblasto que pudieran ser homólogas a la fertilina, una proteína implicada en la fusión de membranas entre el espermatozoide y el gameto femenino. Yagami-Hiromasa y col. (1995) hallaron que una de estas meltrinas (meltrina-α) es expresada en los mioblastos al mismo tiempo que comienza la fusión y que el RNA antisentido para el mensajero de meltrina-α inhibe la fusión cuando es agregado a los mioblastos.

A medida que los mioblastos se vuelven capaces de fusionarse, otra proteína miogénica bHLH, **miogenina**, se activa. Mientras que MyoD y Myf5 son activas en la especificación del linaje de células musculares, miogenina parece mediar su diferenciación (Bergstrom y Tapscott 2001). La miogenina se une a la región reguladora de varios genes específicos de músculo y activa su expresión.

SITIO WEB 14.4 **Formación de músculo (Muscle formation).** Dos sitios web están centrados sobre el desarrollo muscular. 1) Los términos *hipaxial* y *epaxial* se refieren a las posiciones de los músculos en el adulto. Estudios recientes sugieren el uso de una nomenclatura diferente más acorde con la derivación embrionaria de la musculatura. 2) La investigación en ratones quiméricos ha demostrado que el músculo esquelético llega a ser multinucleado por la fusión de células, mientras que el músculo cardíaco llega a ser multinucleado por divisiones nucleares dentro de una célula.



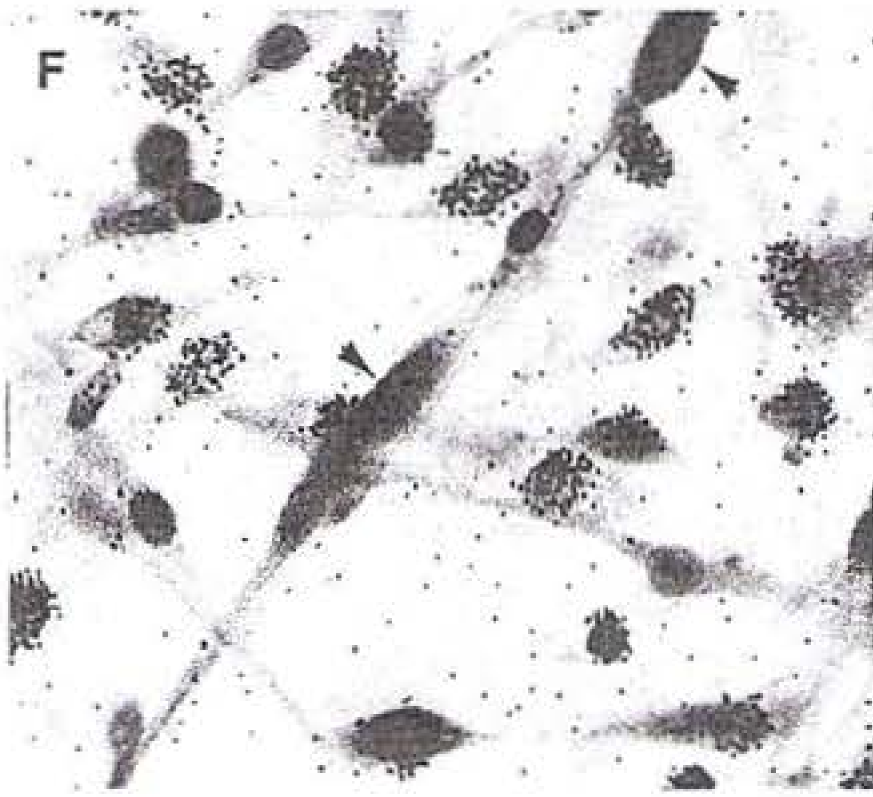


Fig. 14-12. Transformación de mioblastos hacia músculo en cultivo. **A.** Determinación de las células del miotoma por factores paracrinos. **B.** Los mioblastos comprometidos se dividen ante la presencia de factores de crecimiento (primariamente FGF), pero no muestran proteínas obvias específicas de músculo. **C-D.** Cuando los factores de crecimiento se agotan, los mioblastos dejan de dividirse, se alinean y se fusionan en miotubos. **E.** Los miotubos se organizan en fibras musculares que se contraen espontáneamente. **F.** Autorradiografía que muestra la síntesis de DNA en los mioblastos y la salida del ciclo celular de las células que se están fusionando. La fosfolipasa C puede "congelar" a los mioblastos después de que ellos son alineados con otros mioblastos pero antes de que sus membranas se fusionen. Los mioblastos cultivados fueron tratados con fosfolipasa C y luego expuestos a timidina radiactiva. Los mioblastos sin adherirse continúan dividiéndose y, por lo tanto, incorporando la timidina radiactiva en su DNA. Las células alineadas (pero no fusionadas) (flechas) no incorporan la marca. (A-E, según Wolpert 1998; F, de Nameroff y Munar 1976, fotografía cortesía de M. Nameroff.)

Osteogénesis: el desarrollo de los huesos

Algunas de las estructuras más obvias derivadas del mesodermo paraxial son los huesos. Aquí, solo se dará un breve resumen de los mecanismos de formación del hueso, se invita a los estudiantes deseosos de más detalles a consultar los libros de texto de histología que dedican capítulos enteros a este tema.

Hay tres linajes distintos que generan el esqueleto. Los somitas generan el esqueleto axial, la lámina del mesodermo lateral genera el esqueleto del miembro y la cresta neural craneal da origen a los huesos y cartílagos del arco branquial.* Hay dos modos principales de formación de hueso u **osteogénesis**, y ambos involucran la transformación de un tejido mesenquimático preexistente en tejido óseo. La transformación directa de tejido mesenquimático a óseo es denominada **osificación intramembranosa** (o **dérmica**) y fue discutida en los capítulos anteriores. En otros casos, las células mesenquimáticas se diferencian hacia cartílago y este cartílago es posteriormente reemplazado por hueso. El proceso por el cual se forma un cartílago intermediario se reemplaza por células óseas es denominado **osificación endocondral.**

* El desarrollo del cartílago craneofacial fue discutido en el capítulo 13 y será revisado nuevamente en el capítulo 22; el desarrollo de los miembros será detallado en el capítulo 16.

Osificación endocondral

La osificación endocondral involucra la formación de tejido **cartilaginoso** a partir de células mesenquimáticas agregadas y el posterior reemplazo del tejido cartilaginoso por hueso (Horton 1990). Éste es el tipo de formación de hueso característico de las vértebras, las costillas y los miembros. Las vértebras y las costillas se forman desde los somitas, mientras que los huesos de los miembros (discutido en el capítulo 16) se forman desde la lámina del mesodermo lateral. Una vértebra individual no se forma directamente desde un único somita (Aoyama y Asamoto 2000; Morin-Kensicki y col. 2002). En su lugar, una vértebra particular se forma desde la mitad posterior de un somita y la mitad anterior del siguiente. (De este modo, la segmentación de la vértebra se asemeja a la transición de parasegmento a segmento en el desarrollo del insecto.)

El proceso de osificación endocondral puede dividirse en cinco estadios (fig. 14-13). En primer lugar, las células mesenquimáticas se comprometen a ser células cartilaginosas. Este compromiso es causado por factores paracrinos que inducen a las células mesodérmicas vecinas a expresar dos factores de transcripción, Pax1 y **Scleraxis**. Se piensa que estos factores de transcripción activan a genes específicos de cartílago (Cserjesi y col. 1995; Sosic y col. 1997). Por lo tanto, Scleraxis es expresado en el mesénquima del esclerotoma, en el mesénquima facial que transforma los precursores cartilaginosos a hueso y en el mesénquima la extremidad (fig. 14-14).

Durante la segunda fase de la osificación endocondral, las células mesenquimáticas se condensan en nódulos compactos y se diferencian a **condrocitos**, las células de

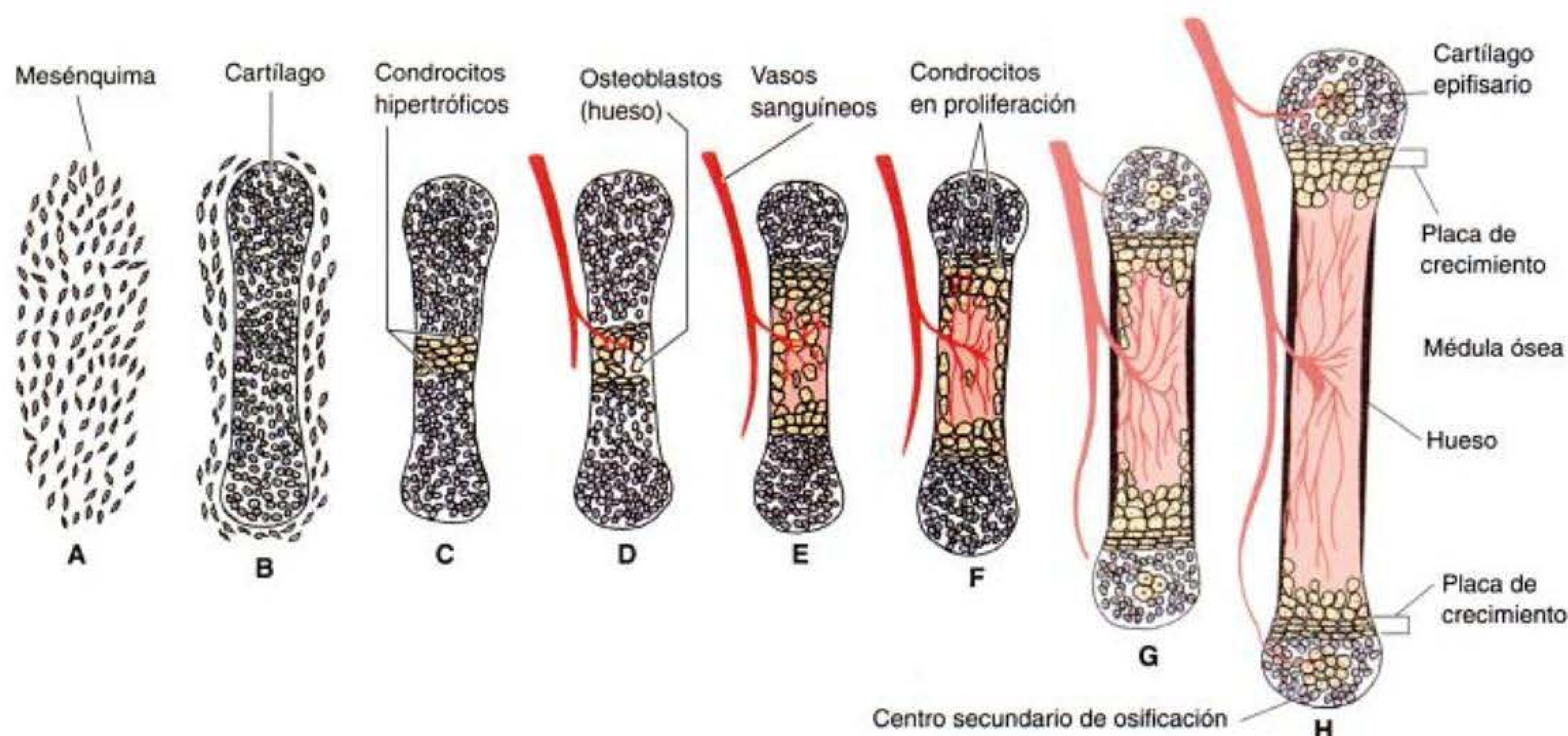


Fig. 14-13. Diagrama esquemático de la osificación endocondral. **A, B.** Las células mesenquimáticas se condensan y diferencian a condrocitos para formar el molde cartilaginoso del hueso. **C.** Los condrocitos en el centro de la diáfisis experimentan hipertrofia y apoptosis mientras que cambian y mineralizan su matriz extracelular. Su muerte permite el ingreso de los vasos sanguíneos. **D, E.** Los vasos sanguíneos traen osteoblastos, que se unen a la matriz cartilaginosa degenerada y depositan matriz ósea. **F–H.** La formación y crecimiento del hueso consiste en formaciones ordenadas de condrocitos en proliferación, en hipertrofia y en mineralización. Los centros de osificación secundaria también se forman a medida que ingresan los vasos sanguíneos cerca de los extremos del hueso. (Según Horton 1990.)

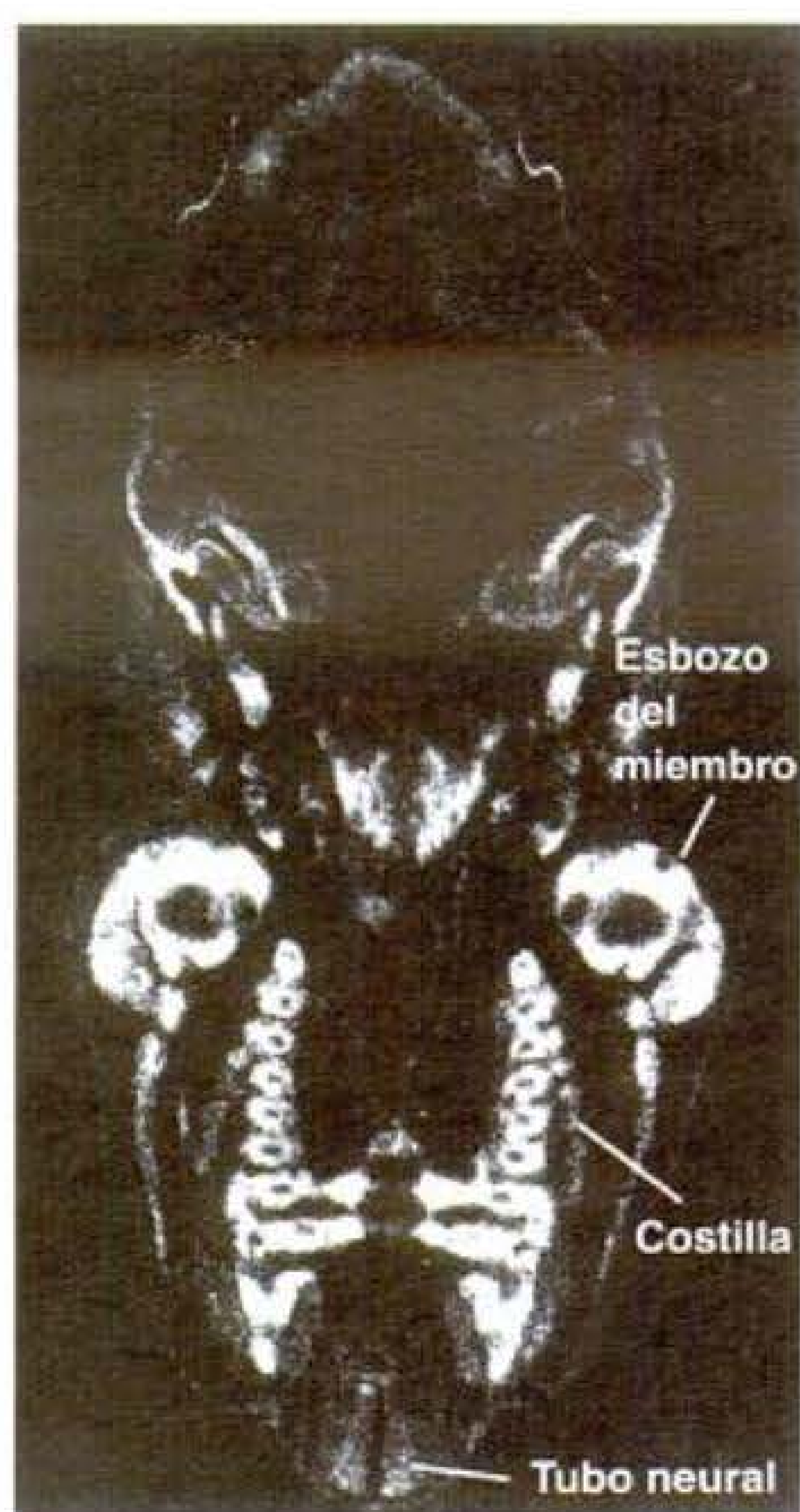


Fig. 14-14. Localización del mensajero *scleraxis* (áreas iluminadas) en los sitios de la formación de condrocitos en un embrión de ratón de 11,5 días. Los transcritos de *scleraxis* son vistos en el cartílago de la nariz y de la cara que se está condensando y en los precursores de los miembros y de las costillas. (Según Cserjesi y col. 1995, microfotografía cortesía de E. Olson.)

cartílago. La cadherina-N parece ser importante en el inicio de estas condensaciones y N-CAM parece ser crítica para su mantenimiento (Oberlender y Tuan 1994; Hall y Miyake 1995). En los seres humanos, el gen *SOX9*, que codifica una proteína que se une al DNA, es expresado en las condensaciones precartilaginosas. Las mutaciones del gen *SOX9* causan displasia camptomélica, un trastorno poco frecuente del desarrollo esquelético que produce deformidades de la mayor parte de los huesos del cuerpo. La mayoría de los recién nacidos afectados mueren por falla respiratoria debido a malformaciones de la tráquea y de los cartílagos costales (Wright y col. 1995).

Durante la tercera fase de osificación endocondral, los condrocitos proliferan rápidamente para formar el molde de cartílago para el hueso. A medida que se dividen, los condrocitos secretan una matriz extracelular específica de cartílago. En la cuarta fase, los condrocitos detienen su división y aumentan de modo espectacular su volumen, convirtiéndose en **condrocitos hipertróficos.** Estos condrocitos grandes alteran la matriz que producen (al agregar colágeno X y más fibronectina) permitiéndole a esta matriz que sea mineralizada (calcificada) por carbonato de calcio. También secretan el factor de angiogénesis, VEGF, que puede transformar a las células mesenquimáticas mesodérmicas en vasos sanguíneos (Gerber y col. 1999; Haigh y col. 2000; véase cap. 15). Un número de acontecimientos conduce a la hipertrofia y mineralización (calcificación) de los condrocitos, incluido un cambio inicial desde la respiración aeróbica a la anaeróbica, que altera su metabolismo celular y el potencial de energía mitocondrial (Shapiro y col. 1982). Los condrocitos hipertróficos secretan numerosas vesículas pequeñas unidas a membrana hacia la matriz extracelular. Estas vesículas contienen enzimas que son activas en la generación

de iones calcio y fosfato e inician los procesos de mineralización dentro de la matriz cartilaginosa (Wu y col. 1997). Los condrocitos están hipertróficos, su metabolismo y membranas mitocondriales alteradas, entonces mueren por apoptosis (Hatori y col. 1995; Rajpurohit y col. 1999).

En la quinta fase, los vasos sanguíneos inducidos por VEGF invaden el molde de cartílago. A medida que los condrocitos hipertróficos mueren, las células que rodean al molde de cartílago se diferencian a **osteoblastos**. Estas células expresan el factor de transcripción **Cbfa1** (también denominado Runx2), que es necesario para el desarrollo de hueso membranoso y endocondral (véase fig. 13-9). El reemplazo de condrocitos por células óseas es dependiente de la mineralización de la matriz extracelular. Esta remodelación libera VEGF y se producen más vasos sanguíneos alrededor del cartílago que está muriendo. Los vasos sanguíneos traen osteoblastos y **condroclastos** (que comen los restos de los condrocitos apoptóticos). Si se inhibe la formación de los vasos sanguíneos, se retrasa significativamente el desarrollo del hueso (Yin y col. 2002; véase Karsenty y Wagner 2002). Los osteoblastos comienzan a formar matriz ósea sobre la matriz parcialmente degradada y construyen un **collar óseo** alrededor de las células de cartílago que están muriendo (Bruder y Caplan 1989; Hatori y col. 1995; St. Jacques y col. 1999). Finalmente, todo el cartílago es reemplazado por hueso. Por lo tanto, el tejido cartilaginoso sirve como molde para el hueso que sigue. Los componentes esqueléticos de la columna vertebral, de la pelvis, de los miembros y de las porciones del cráneo se forman primero de cartílago y luego llegan a ser óseos.

La importancia de la matriz extracelular mineralizada para la diferenciación ósea es claramente ilustrada en el desarrollo del esqueleto del embrión de pollo, que utiliza el carbonato de calcio de la cáscara del huevo como su fuente de calcio. Durante el desarrollo, el sistema circulatorio del embrión de pollo trasloca cerca de 120 mg de calcio desde la cáscara al esqueleto (Tuan 1987). Cuando se les extirpa la cáscara a los embriones de pollo en el día 3 y crecen en cultivos con menos cáscara (en una envoltura de plástico) por la duración del desarrollo, la mayoría del esqueleto cartilaginoso falla en su maduración hacia tejido óseo (fig. 14-15; Tuan y Lynch 1983).

SITIO WEB 14.5 **Factores paracrinos, sus receptores y crecimiento óseo humano (Paracrine factors, their receptors, and human bone growth).** Las mutaciones en los genes que codifican factores paracrinos y sus receptores causan numerosas anomalías esqueléticas en seres humanos y en ratones. Las vías de FGF y Hedgehog son especialmente importantes.

Osteoclastos

Nuevo material óseo es agregado periféricamente desde la superficie interna del **periostio,** una vaina fibrosa que contiene tejido conectivo y capilares que cubren al hueso en desarrollo. Al mismo tiempo, hay un ahuecamiento de la región interna del hueso para formar la cavidad de la médula ósea. Esta destrucción ósea es llevada a cabo por los **osteoclastos**, células multinucleadas que ingresan al hueso a través de los vasos sanguíneos (Kahn y Simmons 1975; Manolagas y Jilka 1995). Los osteoclastos son derivados de los precursores de las células sanguíneas denominados monocitos y ellos disuelven las porciones inorgánicas y proteicas de la matriz ósea (Ash y col. 1980; Blair y col. 1986). Cada osteoclasto extiende numerosos procesos celulares hacia la matriz y bombea iones hidrógeno fuera, hacia el material que lo rodea, de este modo lo acidifica y solubiliza* (fig. 14-16; Baron y col. 1985, 1986). Los vasos sanguíneos también importan células formadoras de sangre que se localizarán en la médula ósea por toda la vida del organismo. El número y la actividad de los osteoclastos deben estar estrechamente regulados. Si hay muchos osteoclastos activos, será disuelto demasiado hueso y causará **osteoporosis**. Por el contrario, si no son producidos suficientes osteoclastos, los huesos no se ahuecan para formar médula y produce **osteopetrosis** (Tondravi y col. 1997; Duong y Rodan 2001).

* Debido a la fisiología del osteoclasto, ahora podemos apreciar la profética intuición de H. L. Mencken (1919): "La vida es una lucha, no contra el pecado, no contra el Poder del Dinero, no contra el magnetismo animal malicioso, sino contra los iones hidrógeno".

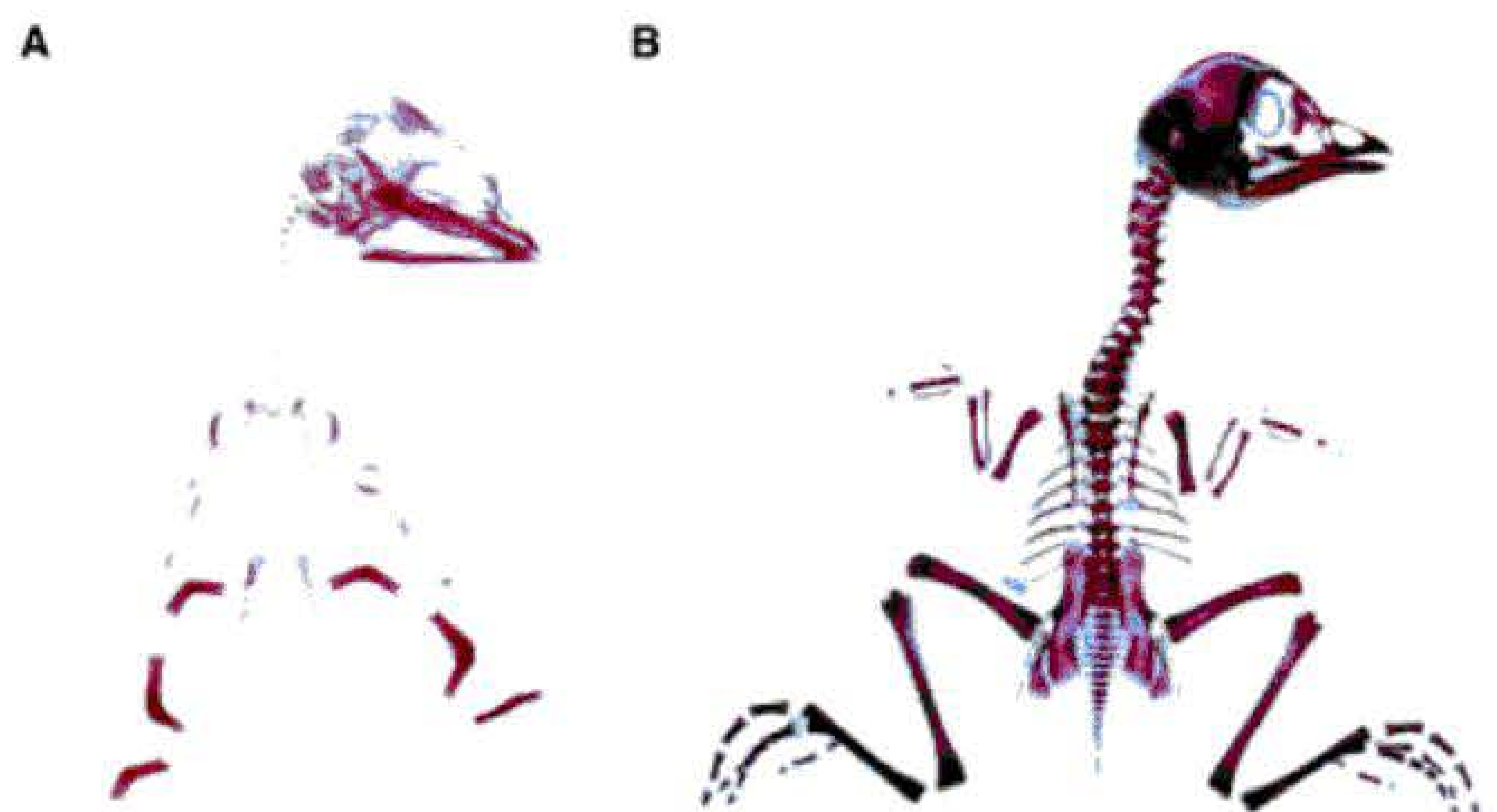


Fig. 14-15. Mineralización esquelética en los embriones de pollo de 19 días que se desarrollaron, A, en cultivo con menos cáscara y B, dentro de un huevo durante la incubación normal. Los embriones fueron fijados y teñidos con rojo de alizarin para mostrar la matriz ósea calcificada. (De Tuan y Lynch 1983; fotografías cortesía de R. Tuan.)

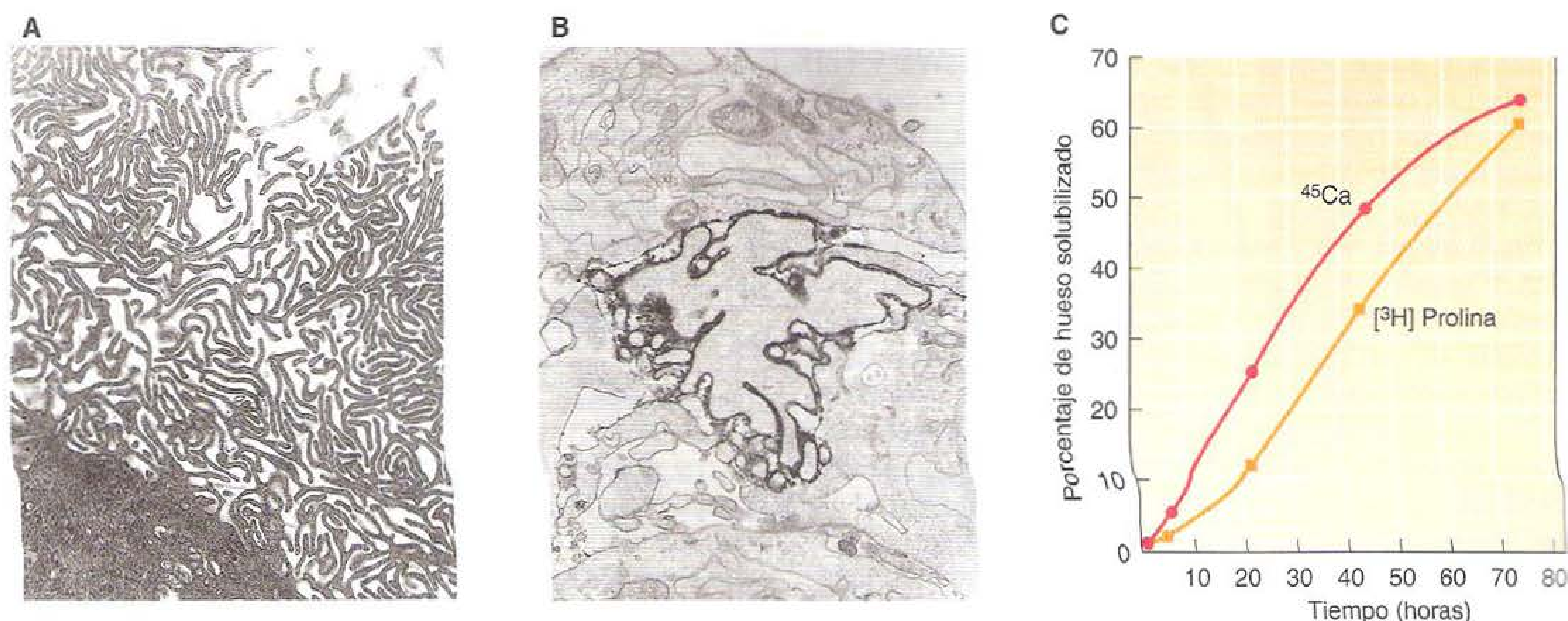


Fig. 14-16. Actividad osteoclástica sobre la matriz ósea. **A.** Microfotografía electrónica del borde estriado de un osteoclasto de pollo cultivado sobre matriz ósea reconstituida. **B.** Sección del borde estriado teñido para la presencia de una ATPasa capaz de transportar iones de hidrógeno desde la célula. La ATPasa está restringida a la membrana del proceso celular. **C.** Solubilización de los componentes inorgánicos y de colágeno de la matriz (medidos por la liberación de [^{45}Ca] y [^{3}H] prolina, respectivamente) por 10.000 osteoclastos incubados sobre fragmentos óseos marcados. (A y C, de Blair y col. 1986; B, de Baron y col. 1986. Microfotografías cortesía de los autores.)

SITIO WEB 14.6 **Diferenciación del osteoclasto (Osteoclast differentiation).** Las hormonas regulan la producción de osteoclastos y los cambios hormonales del envejecimiento pueden causar osteoporosis mediante el incremento del número de osteoclastos. La transformación de una célula madre macrofágica a osteoclasto es regulada por la osteoprotegerina y su ligando. Se piensa que las señales del osteoblasto instruyen a la célula progenitora a ser un osteoclasto.

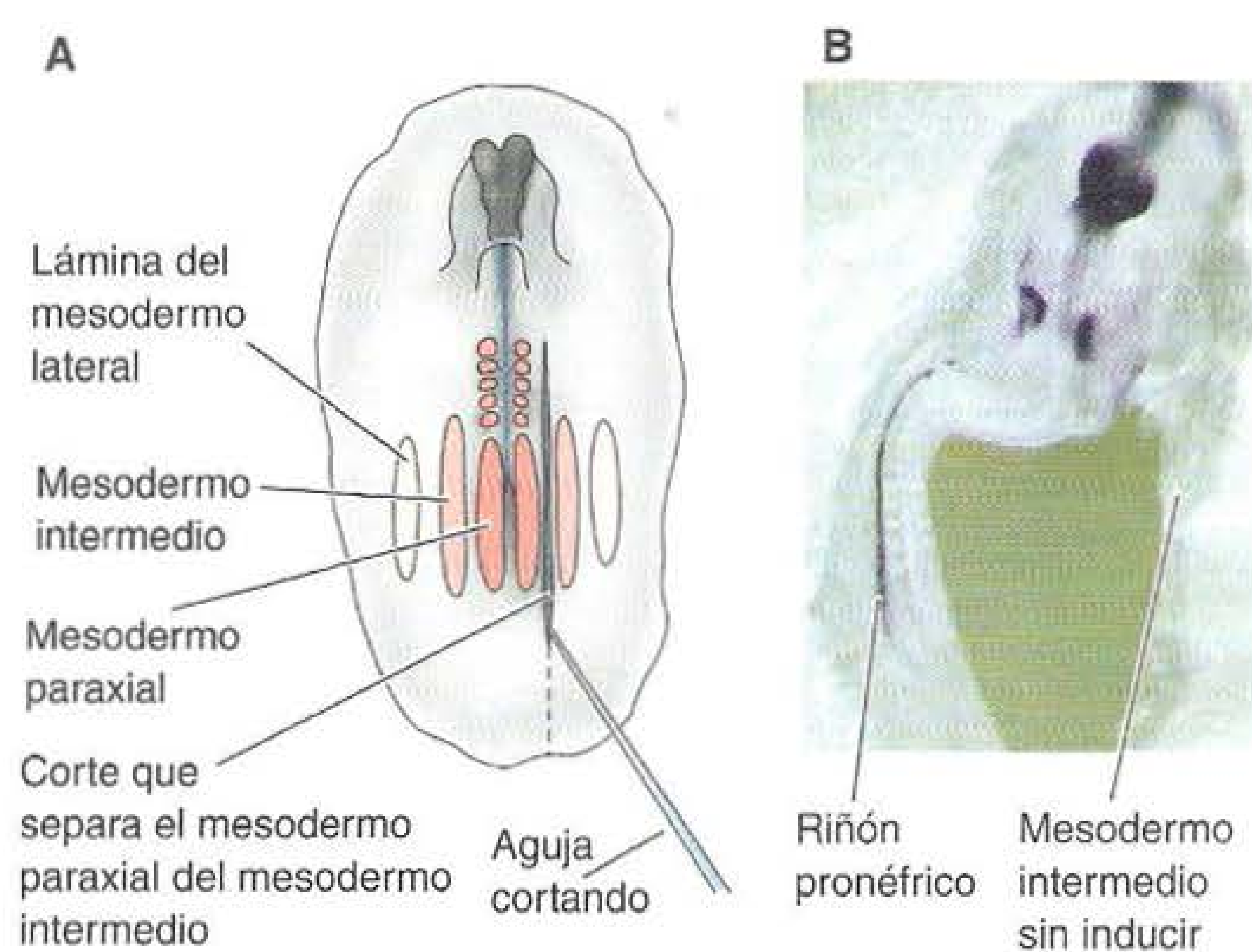


Fig. 14-17. Las señales desde el mesodermo paraxial inducen la formación de pronefros en el mesodermo intermedio del embrión de pollo. **A.** El mesodermo paraxial fue separado quirúrgicamente del mesodermo intermedio sobre el lado derecho del cuerpo. **B.** Como resultado, se desarrolló un conducto pronéfrico (túbulos teñidos de Pax2) solamente del lado izquierdo. (Según Mauch y col. 2000; fotografía cortesía de T. J. Mauch y G. C. Schoenwolf.)

MESODERMO INTERMEDIO: EL SISTEMA UROGENITAL

El mesodermo intermedio genera el sistema urogenital: los riñones, las gónadas y sus respectivos sistemas de conductos. Se reservarán las gónadas para la discusión sobre la determinación del sexo en el capítulo 17, aquí se concentrará el estudio del desarrollo del riñón de mamíferos.

La especificación del mesodermo intermedio

El mesodermo intermedio del embrión de pollo adquiere su capacidad para formar riñones a través de sus interacciones con el mesodermo paraxial. Mauch y col. (2000) demostraron que las señales desde el mesodermo paraxial inducían la formación de pronefros en el mesodermo intermedio del embrión de pollo. Ellos cortaron a los embriones en desarrollo de modo tal que el mesodermo intermedio no podía contactar con el mesodermo paraxial sobre uno de los lados del cuerpo. Ese lado del cuerpo (donde fue eliminado el contacto con el mesodermo paraxial) no formó riñones, pero el lado sin alterar fue capaz de formar riñones (fig. 14-17). El mesodermo paraxial parece ser necesario y suficiente para la inducción de la capacidad de formar riñón en el mesodermo intermedio, debido a que el cultivo simultáneo de la lámina del mesodermo lateral con mesodermo paraxial lleva a la formación de túbulos pronéfricos en la lámina del mesodermo lateral y ningún otro tipo de célula llevaría a cabo esto.

Bouchard y col. (2002) han demostrado que el mesodermo intermedio de ratón que carece de los genes que codifican los factores de transcripción Pax2 y Pax8 (pero

no por separado) es incapaz de formar cualquier estructura renal. Además, sin estas dos proteínas, el mesodermo intermedio presuntivo experimenta apoptosis. Es probable, entonces, que el mesodermo paraxial envíe algunas señales todavía desconocidas que inducen la expresión de *Pax2* y *Pax8* en el mesodermo intermedio y estos dos factores de transcripción comienzan a formar el riñón.

Desarrollo de los tipos de riñón

La importancia del riñón no se puede sobreestimar. Como Homer Smith observó (1953), "nuestros riñones constituyen el principal fundamento de nuestra filosofía de libertad. Solo porque ellos funcionan en el sentido en el que lo hacen llega a ser posible para nosotros tener hueso, músculos, glándulas y cerebro." Mientras que esta afirmación puede parecer una hipérbole, el riñón humano es un órgano increíblemente complejo. Su unidad funcional, **la nefrona**, contiene más de 10000 células y al menos 12 tipos celulares diferentes, con cada tipo celular localizado en un lugar particular en relación a otros a lo largo de la extensión de la nefrona.

El desarrollo del riñón de mamíferos progresa a través de tres estadios principales. Los primeros dos estadios son transitorios; solo el tercero y último persiste como un riñón funcional. Temprano en el desarrollo (día 22 en humanos, día 8 en ratones), se origina el **conducto pronéfrico** en el mesodermo intermedio justo ventral a los somitas anteriores. Las células de este conducto migran caudalmente y la región anterior del conducto induce al mesénquima adyacente a formar los túbulos del riñón inicial, el **pronefros** (fig. 14-18A). Mientras que los túbulos pronéfricos forman riñones funcionales en los peces y en las larvas de anfibios, se piensa que no son activos en amniotas. En mamíferos, los túbulos pronéfricos y la porción anterior del conducto pronéfrico degeneran, pero persisten las porciones más caudales del conducto pronéfrico y sirven como componente central del sistema excretorio durante el desarrollo (Toivonen 1945; Saxén 1987). Este conducto remanente a menudo es referido como el **conducto néfrico** o de **Wolff.***

A medida que degeneran los túbulos pronéfricos, la porción media del conducto néfrico induce un nuevo grupo de túbulos renales en el mesénquima adyacente. Este grupo de túbulos constituye el **mesonefros** o riñón mesonéfrico (fig. 14-18B; Sainio y Raatikainen-Ahokas 1999). En algunas especies de mamíferos, el mesonefros funciona por poco tiempo en la filtración de orina, pero en ratones y ratas, no se encuentra como un riñón funcional. En humanos, se forman cerca de 30 túbulos mesonéfricos, comenzando alrededor del día 25. A medida que son inducidos más túbulos caudalmente, los túbulos mesonéfricos anteriores comienzan una regresión mediante apoptosis (aunque en ratones, los túbulos anteriores se mantienen mientras que los posteriores llevan cabo una regresión: fig. 14-18C, D). Mientras que todavía se desconoce si el mesonefros humano funciona verdaderamente filtrando sangre y produciendo orina, el mesonefros proporciona importantes funciones de desarrollo durante su breve existencia. En primer lugar, como se verá en el capítulo 15, es la fuente de las células madre hematopoyéticas necesarias para el desarrollo de las células sanguíneas (Medvinsky y Dzierzak 1996; Wintour y col. 1996). En segundo lugar, en los mamíferos machos, algunos túbulos mesonéfricos persisten para llegar a ser los túbulos que transportan los espermatozoides (el conducto deferente y los conductillos eferentes) de los testículos (véase cap. 17).

El riñón permanente de amniotas, el **metanefros**, es generado por algunos de los mismos componentes que los tipos de riñones transitorios más tempranos (fig. 14-18C). Se piensa que se origina mediante un complejo grupo de interacciones entre los componentes epitelial y mesenquimático del mesodermo intermedio. En las primeras etapas, se forma el **mesénquima metanefrogénico** localizado en las regiones del mesodermo intermedio más posteriores e induce la formación de una rama desde cada uno del par de conductos néfricos (conducto de Wolff). Estas ramas epiteliales son denominadas los **brotes ureterales**. Estos brotes finalmente se separan del conducto néfrico (de Wolff) para llegar a ser los uréteres que llevan la orina hacia la vejiga. Cuando los brotes ureterales surgen desde el conducto néfrico (de Wolff), ingresan al mesénquima metanefrogénico. Los brotes ureterales inducen a este tejido mesenquimático a condensarse alrededor de éstos y a diferenciarse a las nefronas del riñón de mamíferos. A medida que este mesénquima se diferencia, le dice al brote ureteral que se ramifique y crezca.

Interacciones recíprocas de los tejidos renales en desarrollo

Los dos tejidos de mesodermo intermedio –el brote ureteral y el mesénquima metanefrogénico– interactúan y se inducen recíprocamente para formar el riñón (fig. 14-19). El mesénquima metanefrogénico hace que el brote ureteral se alargue y ramifique. Los extremos de estas ramificaciones inducen a las células de mesénquima laxo a formar agregados epiteliales. Cada nódulo agregado de cerca de 20 células proliferará y se diferenciará hacia una complicada estructura de una nefrona renal. Cada nódulo primero se alarga en forma de "coma", luego forma un tubo con una característica forma de S. Poco tiempo después, las células de esta estructura epitelial comienzan a diferenciarse en tipos celulares regionalmente específicos, incluidas las células de la cápsula, los **podocitos**, y las células de los túbulos distal y proximal.* Mientras que esto está sucediendo, los nódulos en epitelización rompen la lámina basal de los conductos del brote urete-

* *Nota del traductor:* clásicamente este conducto es denominado pronéfrico, el cual a partir de la región mesonéfrica pasa a denominarse conducto mesonéfrico o de Wolff.

* La compleja coordinación del desarrollo de la nefrona con los capilares sanguíneos de filtrado de las nefronas es llevada a cabo por la secreción de VEGF desde los podocitos. VEGF, como se verá en el siguiente capítulo, es un poderoso inductor de vasos sanguíneos y hace que las células endoteliales de la aorta dorsal formen las asas capilares del aparato de filtración glomerular (Aitkenhead y col. 1998; Klanke y col. 1998).

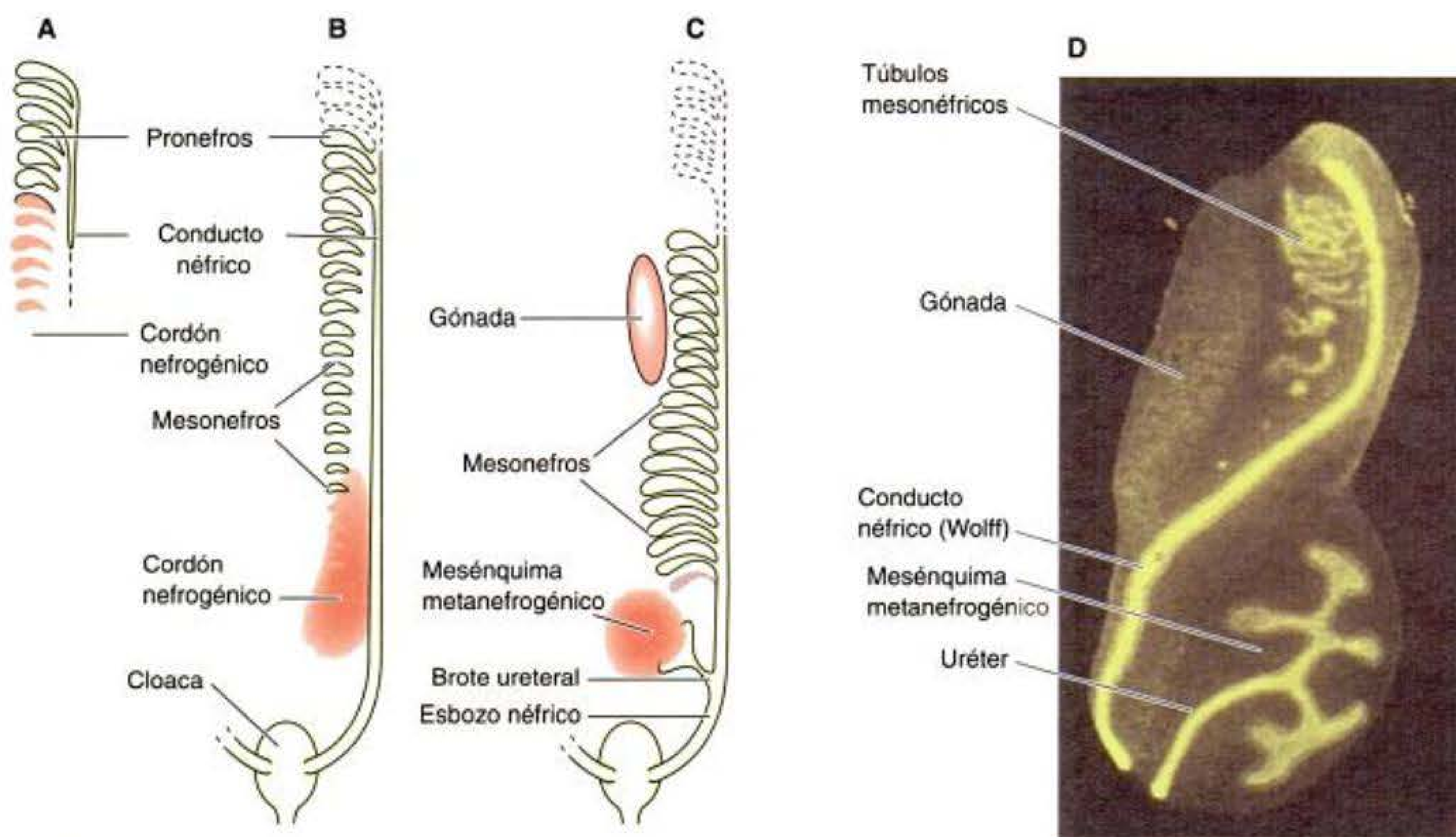


Fig. 14-18. Esquema general de desarrollo en el riñón de vertebrado. **A.** Los túbulos originales, que constituyen el pronefros, son inducidos desde el mesénquima nefrogénico por el conducto pronéfrico a medida que éste migra caudalmente. **B.** A medida que el pronefros degenera, se forman los túbulos mesonéfricos. **C.** El riñon final de los mamíferos, el metanefros, es inducido por el esbozo ureteral que se ramifica desde el conducto néfrico. **D.** El mesodermo intermedio de un embrión de ratón de 13 días muestra el inicio del riñón metanéfrico (inferior) mientras que el mesonefros todavía es aparente. El tejido del conducto está teñido con un anticuerpo fluorescente contra citoqueratina encontrado en el conducto pronéfrico y sus derivados. (**A–C**, según Saxén 1987; **D**, fotografía cortesía de S. Vainio.)

ral y se fusionan con ellos. Esta fusión crea una conexión entre el brote ureteral y el túbulo recién formado, permitiéndole al material pasar de un lado a otro (Bard y col. 2001). Estos túbulos derivados del mesénquima forman las nefronas secretoras del riñon funcional y el brote ureteral ramificado da origen a los conductos colectores renales y al uréter, que vacía la orina de riñón.

Clifford Grobstein (1955, 1956) documentó esta inducción recíproca in vitro. Separó el brote ureteral del mesénquima metanefrogénico y los cultivó individualmente o juntos. Ante la ausencia de mesénquima, el brote ureteral no se ramifica. Ante la ausencia de brote ureteral, el mesénquima rápidamente muere. Sin embargo, cuando ellos son colocados juntos, el brote ureteral crece y se ramifica y a través del mesénquima se forman las nefronas (fig. 14-20).

Los mecanismos de inducción reciproca

La inducción del metanefros puede verse como un diálogo entre el brote ureteral y el mesénquima metanefrogénico. A medida que el diálogo continúa, ambos tejidos son modificados. Mientras que hay varios diálogos simultáneos entre diferentes grupos de células renales (véase Kuure 2000 y Bard 2002 para un informe completo sobre estas conversaciones), parece haber al menos ocho grupos críticos de señales que intervienen en la inducción recíproca del metanefros.

ETAPA 1: FORMACIÓN DEL MESÉNQUIMA METANEFROGÉNICO: HOX-11 Y WT1. Solo el mesénquima metanefrogénico tiene la competencia para responder al brote ureteral para formar los túbulos renales y si es inducido por otros tejidos (como la glándula salival embrionaria o el tejido del tubo neural), este mesénquima responderá formando túbulos renales y no otras estructuras (Saxén 1970; Sariola y col. 1982). Por lo tanto, el mesénquima metanefrogénico no puede llegar a ser cualquier tejido más que nefronas.

Dos grupos de factores de transcripción pueden especificar el mesénquima metanefrogénico. El primer grupo consiste en las proteínas **Hoxa-11**, **Hoxc-11** y **Hoxd-11**. Cuando se hace el knockout de los genes parálogos que codifican estas proteínas en los embriones de ratón, se detiene la diferenciación del mesénquima metanefrogénico y no se puede inducir la formación del brote ureteral (Patterson y col. 2001; Wellik y col. 2002). El segundo grupo de factores de transcripción incluye a **WT1** (del inglés, *Wilms tumor* –tumor de Wilms). Sin WT1, el mesénquima metanefrogénico carece de la competencia para responder a los inductores del brote ureteral y estas células se mantienen sin inducir y mueren (Kreidberg y col. 1993). La hibridación in situ muestra que WT1 normalmente es expresado primero en el mesodermo intermedio previo a la formación del riñón y luego es expresado en el riñón en desarrollo, la gónada y el mesotelio (Pritchard-Jones y col. 1990; van Heyningen y col. 1990; Armstrong y col. 1992). Aunque el mesénquima metanefrogénico aparece homogéneo, puede contener tejido derivado del mesodermo y algunas células de origen de la cresta neural (Le Douarin y Tiellet 1974; Sariola y col. 1989; Sainio y col. 1994).

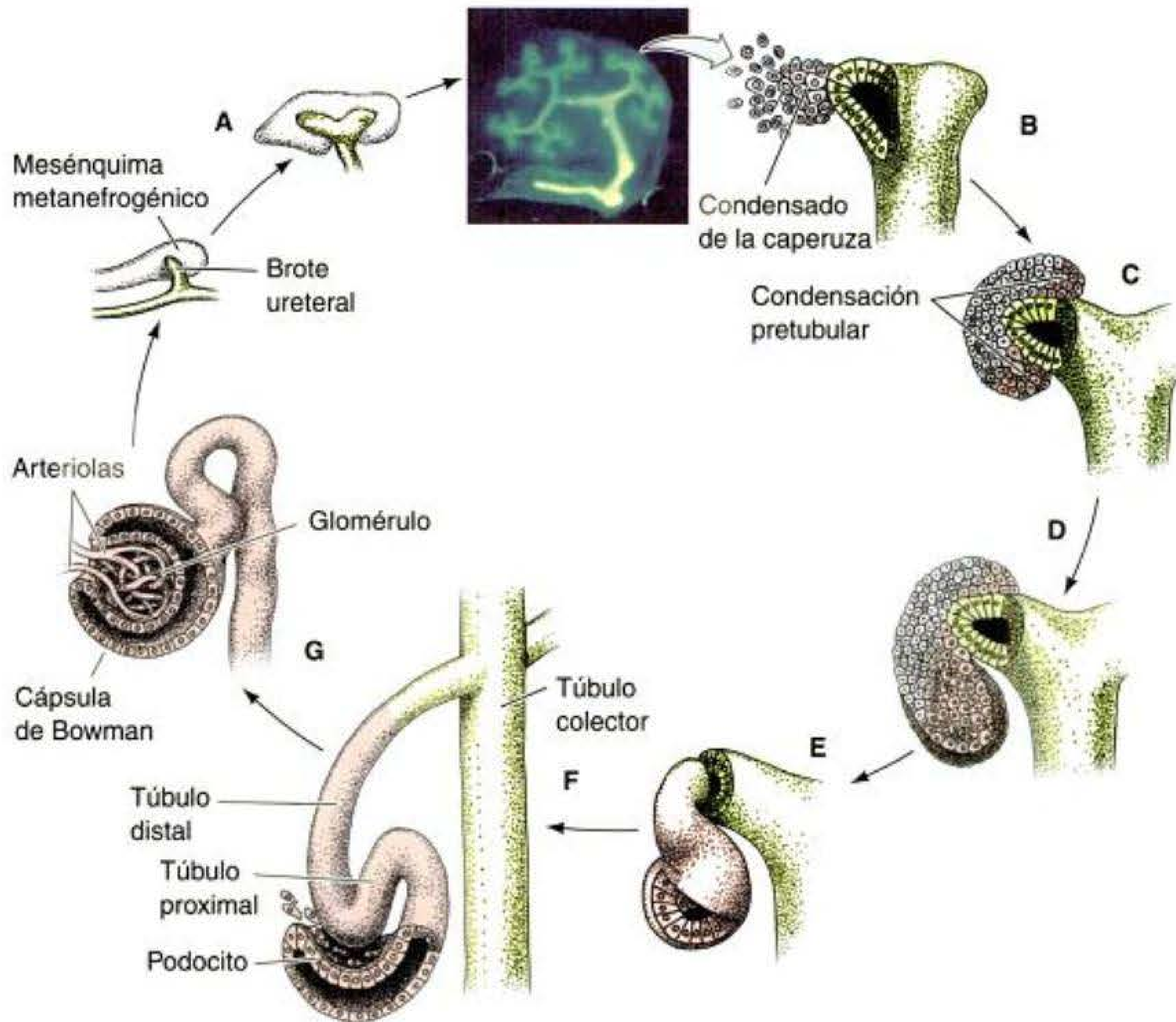


Fig. 14-19. Inducción recíproca en el desarrollo del riñón de mamíferos. **A.** A medida que el esbozo ureteral ingresa en el mesénquima metanefrogénico, el mesénquima induce la ramificación del brote. **B-G.** En los extremos de las ramificaciones, el epitelio induce la condensación del mesénquima y a cavitarse para formar los túbulos y el glomérulo renal (donde se filtra la sangre de la arteriola). Cuando el mesénquima se ha condensado en un epitelio, digiere la lámina basal de las células del brote ureteral que son inducidas por éste a conectarse al epitelio del brote ureteral. Una porción del mesénquima condensado (la condensación pretubular) llega a ser la nefrona (túbulos renales y la cápsula de Bowman), mientras que el brote ureteral llega a ser el conducto colector para la orina. (Según Saxén 1987 y Sariola 2002.)

ETAPA 2: EL MESÉNQUIMA METANEFROGÉNICO SECRETA GDNF PARA INDUCIR Y DIRIGIR EL BROTE URETERAL. La segunda señal en el desarrollo renal es un grupo de moléculas difusibles que provocan la evaginación del brote ureteral desde cada uno de los dos conductos néfricos. Investigación reciente ha demostrado que el **factor neurotrófico derivado de la línea celular glial** (**GDNF**; del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) es un componente crítico de esta señal.* GDNF es sintetizado en el mesénquima metanefrogénico y los ratones en los que se hizo el knoc-

* Éste es el mismo componente que se vio en el capítulo 13 como crítico para la inducción de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de mamíferos. Se volverá a ver GDNF nuevamente cuando se discuta la producción de espermatozoides en el capítulo 19. GDNF es una proteína ocupada.

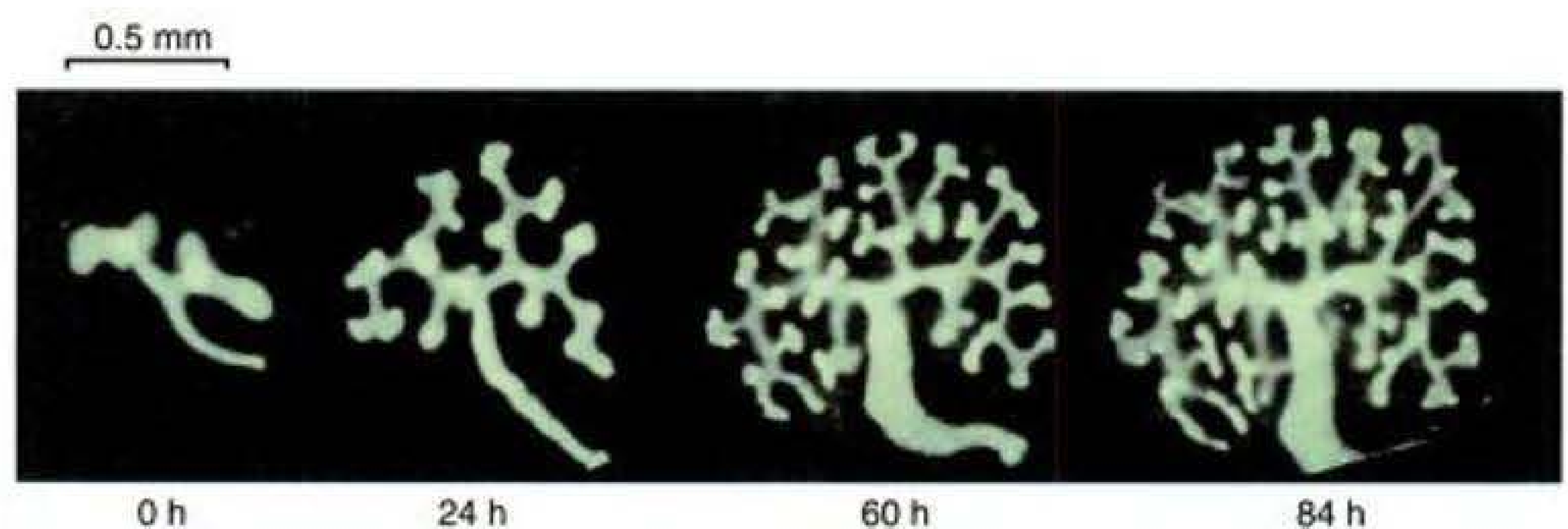


Fig. 14-20. Inducción renal observada in vitro. Un rudimento renal de un embrión de ratón de 11,5 días fue colocado en cultivo. Este ratón transgénico tenía un gen *GFP* fusionado al promotor de *Hoxb-7*, de modo tal que éste expresó la proteína fluorescente verde en el conducto de Wolff (néfrico) y en los brotes ureterales. Debido a que la GFP puede ser fotografiada en tejidos vivos, el riñón podía ser seguido a medida que se desarrollaba. (Según Srinivas y col. 1999; microfotografías cortesía de F. Costantini.)

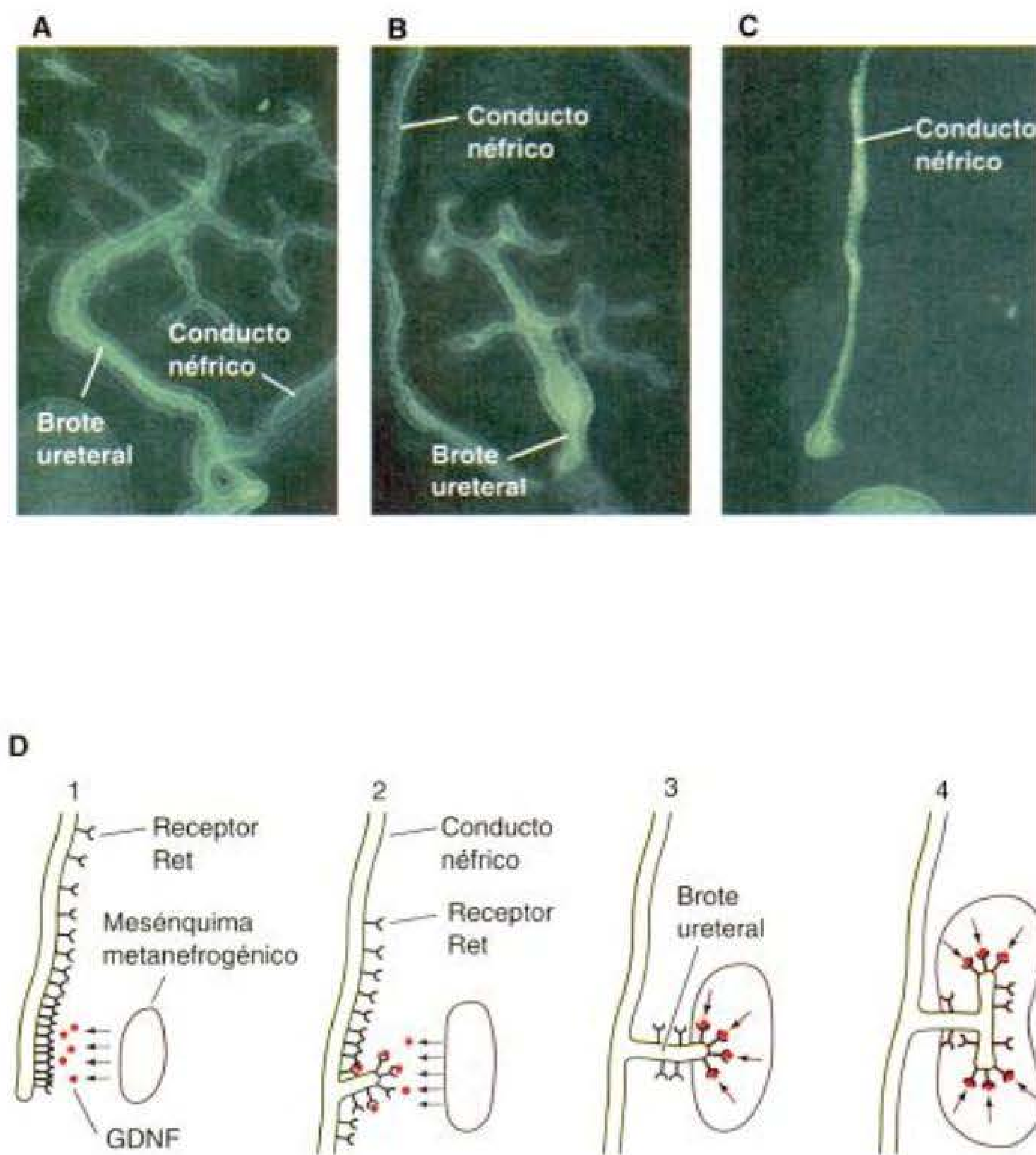


Fig. 14-21. El crecimiento del brote ureteral es dependiente de GDNF y sus receptores. **A.** El brote ureteral de un riñón embrionario de un ratón tipo salvaje de 11,5 días cultivado por 72 horas tiene un patrón de ramificación característico. **B.** En los ratones embrionarios heterocigotas para una mutación del gen que codifica GDNF, el tamaño del brote ureteral y el número y longitud de sus ramificaciones están reducidos. **C.** En embriones de ratón con ambas copias ausentes del gen *gdnf*, el brote ureteral no se forma. (Barras de escala: 100 μm). **D.** Los receptores para GDNF están concentrados en la porción posterior del conducto néfrico. GDNF, que es secretado por el mesénquima metanefrogénico, estimula el crecimiento del brote ureteral desde su conducto. En estadios tardíos, el receptor de GDNF es hallado exclusivamente en los extremos de los esbozos ureterales. (**A-C**, de Pichel y col. 1996, microfotografías cortesía de J. G. Pichel y H. Sariola; **D**, según Schuchardt y col. 1996.)

kout de los genes *gdnf* murieron poco después del nacimiento debido a su agenesia renal (ausencia de riñones) (Moore y col. 1996; Pichel y col. 1996; Sánchez y col. 1996). Los receptores de GDNF (el receptor Ret de tirosinacinasa y el co-receptor GFRα) son sintetizados en los conductos néfricos y posteriormente llegan a ser concentrados en los brotes ureterales en crecimiento (fig. 14-21; Schuchardt y col. 1996). Los ratones que carecen de los receptores GDNF mueren de agenesia renal. Se piensa que GDNF puede llegar a expresarse a través de una vía compleja iniciada por los factores de transcripción Pax2 y Hox-11 (Xu y col. 1999; Wellik y col. 2002).

En otra mutación de ratón, *Danforth short-tail*, el brote ureteral es iniciado pero no entra al mesénquima metanefrogénico (Gluecksohn-Schoenheimer 1943). Aquí, también, el riñón no se forma. Esta falla del crecimiento del brote ureteral ha sido correlacionada con la ausencia de expresión de Wnt11 en los extremos del brote ureteral. La expresión de Wnt11 es mantenida por los proteoglucanos producidos por el mesénquima metanefrogénico. Parece que una vez que el brote ureteral ha entrado al mesénquima, estos proteoglucanos mesenquimáticos estimulan su crecimiento continuo y mantienen la expresión y secreción de Wnt11 (Davies y col. 1995; Kispert y col. 1996).

ETAPA 3: EL BROTE URETERAL SECRETA FGF2 Y BMP7 PARA EVITAR LA APOPTOSIS MESENQUIMÁTICA. La tercera señal en el desarrollo es enviada desde el brote ureteral hacia el mesénquima metanefrogénico y altera el destino de las células mesenquimáticas. Si las células mesenquimáticas dejan de ser inducidas por el brote ureteral experimentan apoptosis (Grobstein 1955; Koseki y col. 1992). Sin embargo si son inducidas por el brote ureteral, las células mesenquimáticas son rescatadas del precipicio de la muerte y se convierten en células madre en proliferación (Bard y Ross 1991; Bard y col. 1996). Los factores secretados desde el brote ureteral incluyen al factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) y la proteína morfogenética del hueso 7 (BMP7). FGF2 tiene tres modos de acción mediante los que inhibe la apoptosis, promueve la condensación de células mesenquimáticas y mantiene la síntesis de WT1 (Perantoni y col. 1995). BMP7 tiene efectos semejantes y ante la ausencia de BMP7, el mesénquima del riñón experimenta apoptosis (véase fig. 14-22; Dudley y col. 1995; Luo y col. 1995).

ETAPA 4: LIF Y WNT6 DESDE EL BROTE URETERAL INDUCEN EL AGREGAMIENTO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS. El brote ureteral también causa cambios drásticos en el comportamiento de las células del mesénquima metanefrogénico, convirtiéndolas en un epitelio. El mesénquima recién inducido sintetiza cadherina-E, que hace que las células mesenquimáticas se agrupen. Estos nódulos agregados de mesénquima ahora sintetizan una lámina basal epitelial que contiene colágeno tipo IV y laminina. Al mismo tiempo, las células mesenquimáticas sintetizan receptores para laminina, permitiendo que las células agregadas formen un epitelio (Ekblom y col. 1994; Müller y col. 1997). El citoesqueleto también cambia desde el característico de una célula mesenquimática a uno típico de células epiteliales (Ekblom y col. 1983; Lehtonen y col. 1985).

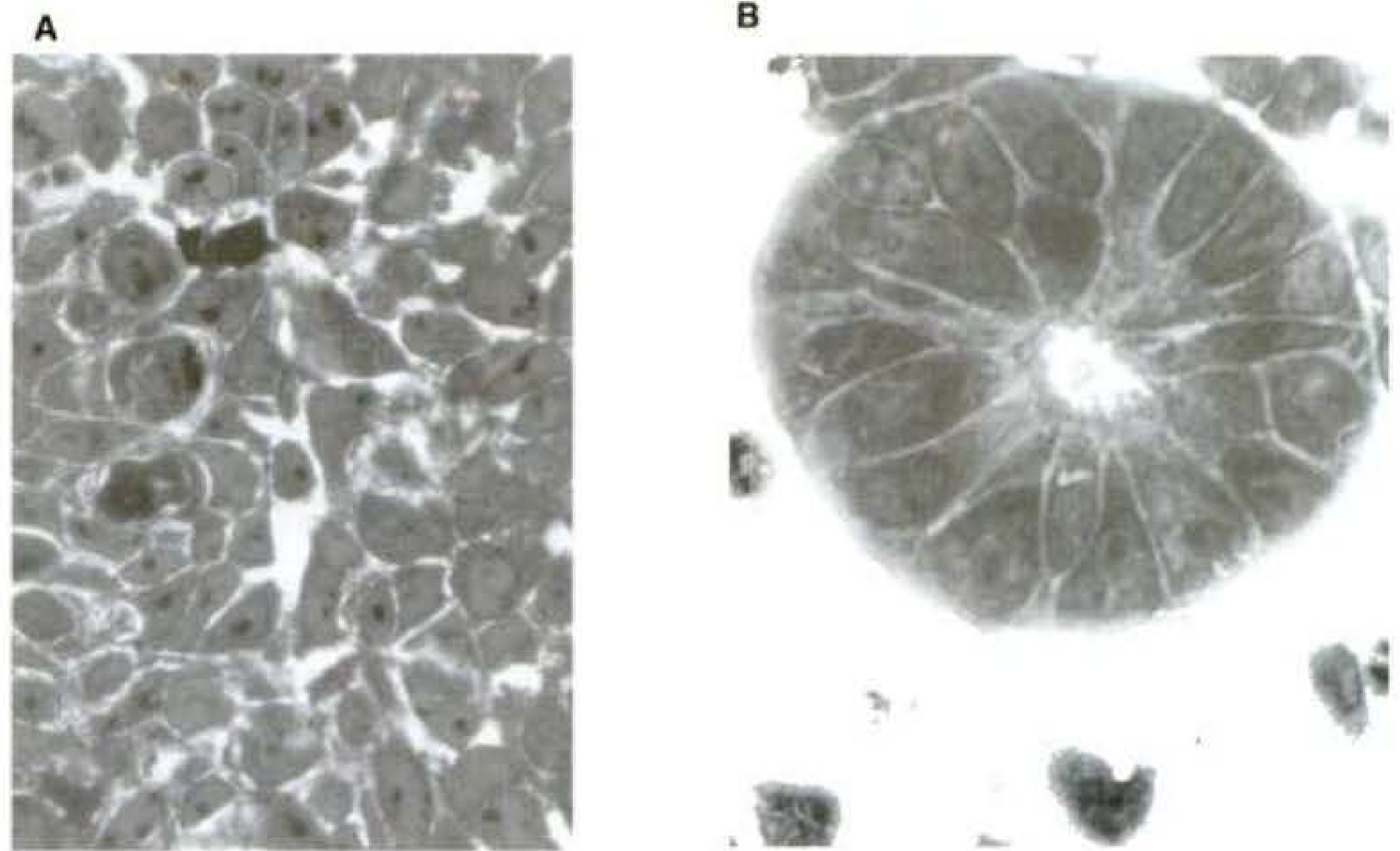


Fig. 14-22. LIF induce la formación de túbulos renales. **A.** El mesénquima metanefrogénico tratado con FGF2 o TGF-ß formará grupos macizos pero no formará epitelio. **B.** El epitelio tubular es inducido cuando el mesénquima tratado con FGF es expuesto a secreciones del brote ureteral o a LiF. (Microfotografías cortesía de J. Barasch.)

La transición desde organización mesenquimática a epitelial puede ser mediada por varias moléculas, incluida la expresión de Pax2 en las células mesenquimáticas recién inducidas. Cuando el RNA antisentido para *Pax2* evita la traducción del mRNA de *Pax2* que es transcrito como una respuesta a la inducción, las células mesenquimáticas del rudimento renal en cultivo no llegan a condensarse (Rothenpieler y Dressler 1993). Por lo tanto, Pax2 puede jugar varios papeles durante la formación del riñón.

Además, FGF2 es necesario para inducir la agregación de las células mesenquimáticas, pero no es capaz de transformar estos agregados en células epiteliales (Karavanova y col. 1996). El factor inhibidor de la Leucemia (LIF) es capaz de convertir los agregados mesenquimáticos en epitelio tubular renal –pero solo si ellos han sido expuestos a FGF2 (fig. 14-22; Barasch y col. 1999). El brote ureteral secreta FGF y LIF y el mesénquima tiene receptores para estas proteínas.

Y finalmente, el mesénquima tiene receptores para Wnt6, otra proteína producida en el extremo del brote ureteral. Wnt6 parece promover la condensación de mesénquima de un modo independiente de FGF (Itäranta y col. 2002).

ETAPA 5: WNT4 CONVIERTE LOS AGREGADOS DE LAS CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS EN UNA NEFRONA. Una vez inducido, y después de que ha comenzado a condensarse, el mesénquima comienza a secretar Wnt4, que actúa de un modo autocrino para completar la transición desde masa mesenquimática a epitelio (Stark y col. 1994; Kispert y col. 1998). La expresión de Wnt4 es hallada en las células de mesénquima en condensación, en los túbulos que resultan en forma de S y en la región donde las células recientemente epitelializadas se fusionan con los extremos del brote ureteral. En ratones que carecen del gen Wnt4, el mesénquima se condensa pero no forma epitelio. Por esta razón, el brote ureteral induce los cambios en el mesénquima metanefrogénico mediante la secreción de FGF, LIF y Wnt6; pero estos cambios están mediados por los efectos de la secreción de Wnt4 sobre el mesénquima en sí mismo.

Una de las moléculas que puede estar involucrada en la transición del agregado mesenquimático a nefrona es el factor de transcripción homeodominio Lim-1 (Karavanov y col. 1998). Esta proteína es hallada en las células mesenquimáticas después de que ellas se han condensado alrededor del brote ureteral y su expresión persiste en la nefrona en desarrollo (fig. 14-23). Otras dos proteínas que pueden ser críticas para la conversión de las células agregadas hacia una nefrona son las policistinas 1 y 2. Estas proteínas son los productos de los genes cuya pérdida de función de los alelos da origen a la enfermedad poliquística renal. Los ratones deficientes en estos genes tienen nefronas anormales e hinchadas (Ward y col. 1996; van Adelsberg y col. 1997).

ETAPA 6: LAS SEÑALES DESDE EL MESÉNQUIMA INDUCEN A LA RAMIFICACIÓN DEL BROTE URETERAL. Evidencia reciente ha implicado a varios factores paracrinos en la ramificación del brote ureteral y estos factores probablemente funcionen empujando y tirando. Algunos factores pueden preservar la matriz extracelular que ro-

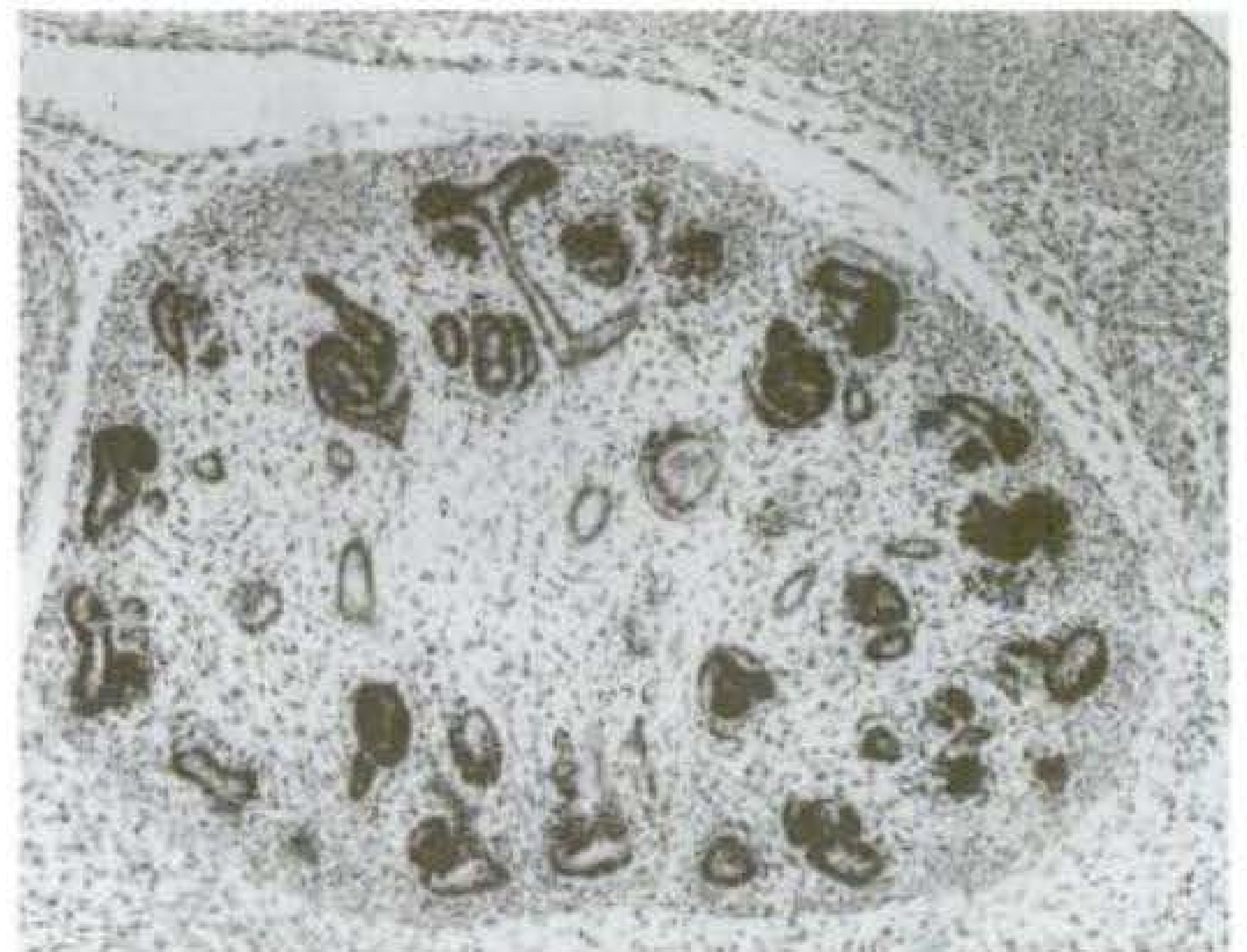


Fig. 14-23. Expresión de Lim-1 (tinción oscura) en un riñón de un ratón embrionario de 19 días. La hibridación in situ muestra altos niveles de expresión en los cuerpos recién epitelizados con forma de coma y con forma de S que llegarán a ser nefronas. (De Karavanov y col. 1998; microfotografía cortesía de A. A. Karavanov)

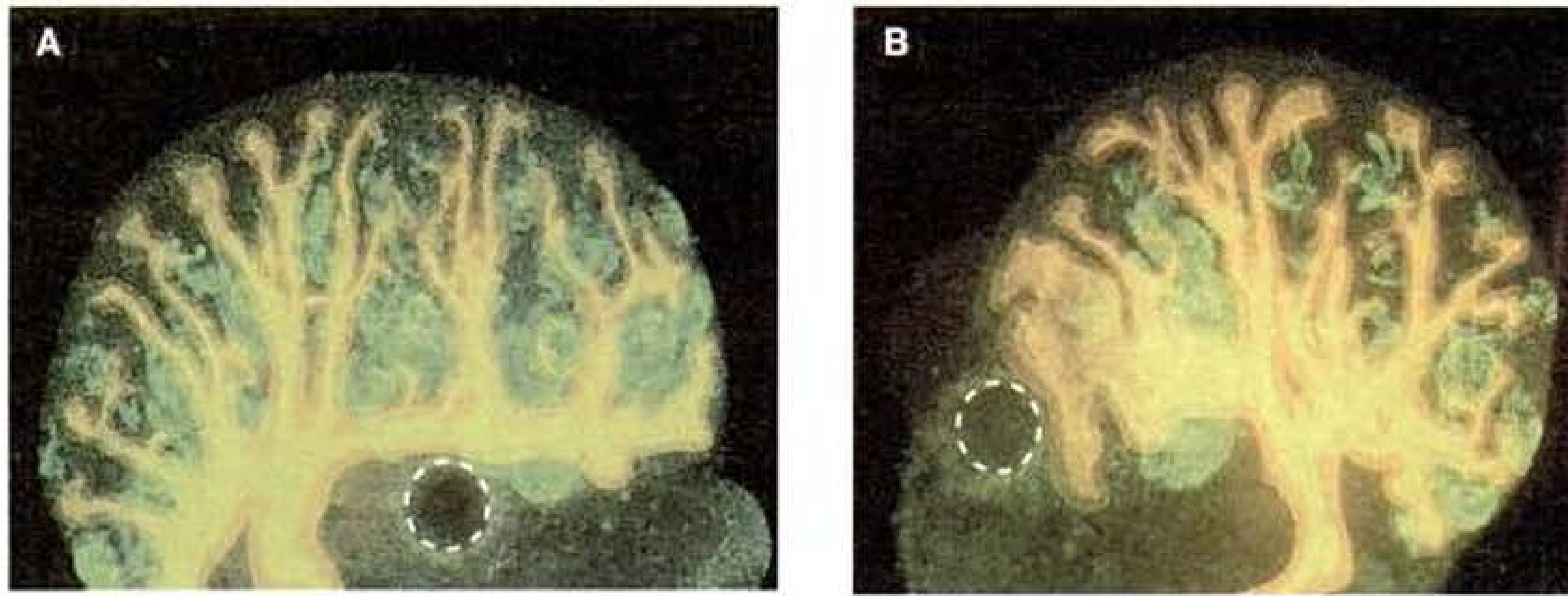


Fig. 14-24. Efecto de GDNF sobre la ramificación del epitelio ureteral. El brote ureteral y sus ramificaciones son teñidas de naranja (con anticuerpos para citoqueratina 18), mientras que las nefronas son teñidas de verde (con anticuerpos para los antígenos del ribete en cepillo de la nefrona). **A.** El riñón de un embrión de ratón de 13 días cultivado 2 días con una bolita control (círculo) tenía un patrón de ramificación normal. **B.** Un riñón similar cultivado 2 días con bolitas de GDNF muestra un patrón distorsionado, a medida que son inducidas nuevas ramificaciones en la vecindad de la bolita. (De Sainio y col. 1997; microfotografías cortesía de K. Sainio.)

dea al epitelio, evitando de este modo que tenga lugar la ramificación. Por el contrario, otros factores pueden causar la digestión de la matriz extracelular, permitiendo que se produzca la ramificación.

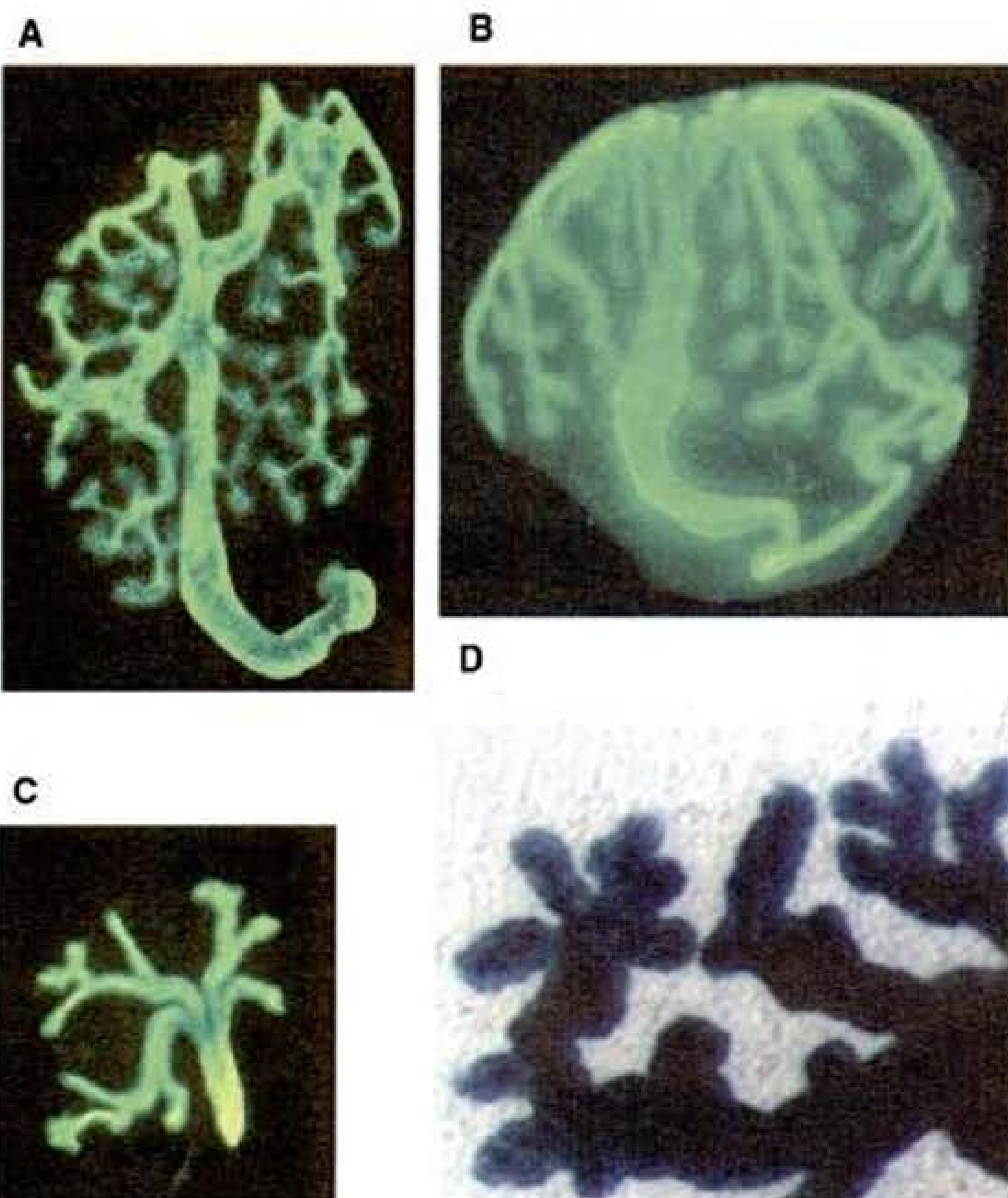


Fig. 14-25. Moléculas de señalización y la ramificación del epitelio ureteral. **A.** Un riñón de un embrión de ratón de 11 días cultivado por 4 días en un medio control tiene un patrón de ramificación normal. **B.** Un riñón de un ratón de 11 días cultivado en TGF-β1 no muestra ramificaciones hasta que alcanza la periferia del mesénquima y las ramificaciones formadas son alargadas. **C.** Un riñón de un ratón de 11 días cultivado en activina (que activa el mismo receptor que BMP4) muestra una destacada distorsión de las ramificaciones. **D.** La ramificación epitelial de las células renales que crece en el mesénquima pulmonar se produce de un modo similar a la del epitelio pulmonar. (A–C, de Ritvos y col. 1995; D, de Lin y col. 2001. Microfotografías cortesía de Y. Lin y S. Vainio.)

El primer candidato para la regulación de la ramificación del brote ureteral es GDNF (Sainio y col. 1997). GDNF del mesénquima no solo induce al brote ureteral inicial del conducto néfrico sino que también puede inducir brotes secundarios del brote ureteral una vez que el brote ha entrado al mesénquima (fig. 14-24). La segunda molécula candidata es el **factor de crecimiento transformante β (TGF-β1)**. Cuando es agregado TGF-β1 exógeno a los cultivos renales, evita la ramificación del epitelio (fig. 14-25B, Ritvos y col. 1995). Se sabe que TGF-β1 promueve la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular e inhibe la digestión de las matrices extracelulares por parte de las metaloproteinasas (Penttinen y col. 1988; Nakamura y col. 1990). Por lo tanto, es posible que TGF-β1 estabilice las ramificaciones una vez que se han formado.

Una tercera molécula que puede ser importante en la ramificación epitelial es **BMP4** (Miyazaki y col. 2000). BMP4 es hallada en las células mesenquimáticas que rodean al conducto néfrico y los receptores de BMP4 son hallados en el tejido epitelial del conducto. Las BMP actúan antagonizando las señales de ramificación y por lo tanto BMP4 restringe la ramificación del conducto a los sitios apropiados. Cuando la cascada de señalización de BMP4 es activada ectópicamente en el rudimento renal embrionario del ratón, distorsiona severamente el patrón de ramificación normal (fig. 14-25C; Ritvos y col. 1995).

La cuarta molécula involucrada en la ramificación es el **colágeno XVIII**. Éste es parte de la matriz extracelular inducida por el mesénquima y puede proporcionar la especificidad para el patrón de ramificación (Lin y col. 2001). El colágeno XVIII es encontrado sobre las ramificaciones del epitelio renal, pero no en los extremos; en el pulmón en desarrollo, se observa el patrón recíproco. Este patrón es generado en parte por GDNF, que regula en menos la expresión de colágeno XVIII por los extremos de las ramas del brote ureteral. Cuando el epitelio del conducto ureteral es incubado en el mesénquima pulmonar, el patrón de expresión de colágeno XVIII que se observa es típico para el del pulmón y el patrón de ramificación se asemeja al del epitelio pulmonar (fig. 14-25D).

ETAPAS 7 Y 8: DIFERENCIACIÓN DE LA NEFRONA Y CRECIMIENTO DEL BROTE URETERAL. Las interacciones que se han descrito hasta este punto crean una **caperuza condensada** de células mesenquimáticas metanéfricas que cubren los extremos de las ramas del brote ureteral. Unas pocas células (quizás alrededor de cinco) de este agregado, situadas en los bordes laterales de la caperuza, comienzan a proliferar rápidamente y a formar la **condensación pretubular**. Esta condensación pretubular dará origen a la nefrona secretoria del riñón. Las otras células de la caperuza condensada regulan las ramificaciones subsiguientes del brote ureteral de modo tal que se pueden formar más ramas (Bard y col. 2001; Sariola 2002).

El factor de transcripción Foxb-2 es sintetizado en las células de la caperuza. Cuando se hace el knockout de Foxb-2 en los embriones de ratón, el riñón resultante carece de un árbol ureteral ramificado (se ramifica tres o cuatro veces en lugar de las siete a ocho normales, resultando en una reducción de 8 a 16 veces en el número de ramas) y el agregado no se diferencia a nefronas (Hatini y col. 1996). Las células de la caperuza también son capaces de convertir la vitamina A en ácido retinoico y utilizar este compuesto para conservar la expresión de Ret (uno de los receptores de GDNF) en el brote ureteral (Batourina y col. 2002). Se ha hallado que las células de la caperuza también secretan FGF7, un factor de crecimiento cuyo receptor se encuentra sobre el brote ureteral. FGF7 es crítico para mantener el crecimiento epitelial ureteral y asegurar un número de nefronas apropiado en el riñón (Qiao y col. 1999).

En el riñón en desarrollo, se ve un arquetipo de interacciones recíprocas necesarias para formar un órgano. También se ve que solo se ha comenzado a entender cómo se forman los órganos.

Resumen: mesodermo paraxial e intermedio

1. El mesodermo paraxial forma bloques de tejidos denominados somitas. Los somitas dan origen a las tres divisiones principales: el esclerotoma, el miotoma y el dermatoma.
2. Los somitas son formados desde la placa segmentaria (mesodermo sin segmentar) mediante las interacciones de varias proteínas. La vía Notch es extremadamente importante en este proceso, y los sistemas del receptor Eph pueden estar involucrados en la separación de los somitas del mesodermo paraxial no segmentado. Cadherina-N, fibronectina y Rac1 parecen ser importantes en hacer que estas células lleguen a ser epiteliales.
3. El dermatoma del somita forma la dermis de la espalda. El esclerotoma del somita forma el cartílago de la vértebra. En las vértebras torácicas, las células del esclerotoma también forman las porciones proximales de las costillas.
4. El miotoma epaxial forma la musculatura de la espalda. El miotoma hipaxial forma los músculos de la pared corporal, de los miembros, del diafragma y de la lengua.
5. Las regiones de los somitas son especificadas por factores paracrinos secretados por los tejidos vecinos. El esclerotoma es especificado en un gran porcentaje por Sonic hedgehog, que es secretado por las células de la notocorda y de la placa del piso. El dermatoma es especificado por neurotrofina-3, secretada por las células de la placa del techo del tubo neural.
6. Las dos regiones de miotoma son especificadas por diferentes factores. El miotoma epaxial es especificado por las proteínas Wnt desde el tubo neural dorsal. El miotoma hipaxial es especificado por BMP4 (y quizás otras proteínas) secretadas por la lámina del mesodermo lateral. En ambos ejemplos, los factores de transcripción miogénicos bHLH son inducidos en los mioblastos hipaxiales y epaxiales –las células que se convertirán en músculo.
7. Para formar músculos, los mioblastos detienen su división, se alinean en miotubos y se fusionan.
8. Los principales linajes que forman el esqueleto son los somitas (esqueleto axial), la lámina del mesodermo lateral (apéndices), y la cresta neural y el mesodermo cefálico (cráneo y cara).
9. Hay dos tipos principales de osificación. En la osificación intramembranosa, que se produce primariamente en los huesos del cráneo y de la cara, el mesénquima es convertido directamente en hueso. En la osificación endocondral, las células mesenquimáticas se convierten en cartílago. Estos moldes cartilaginosos son posteriormente reemplazados por células óseas.
10. El reemplazo de cartílago por hueso durante la osificación endocondral depende de la mineralización de la matriz cartilaginosa.
11. Los osteoclastos remodelan continuamente hueso durante la vida de una persona. El ahuecamiento del hueso para la médula ósea es llevado a cabo por los osteoclastos.
12. El mesodermo intermedio es especificado mediante interacciones con el mesodermo paraxial. Genera los riñones y las gónadas.
13. El riñón metanéfrico de mamíferos es formado por las interacciones recíprocas del mesénquima metanéfrico y una rama del conducto néfrico denominada el brote ureteral.
14. El mesénquima metanefrogénico se hace competente para formar nefronas mediante la expresión de WT1. Se vuelve capaz de secretar GDNF mediante la acción de las proteínas Hox11 y Pax2. GDNF es secretado por el mesodermo e induce la formación del brote ureteral.
15. El brote ureteral secreta FGF2 y BMP7 para evitar la apoptosis en el mesénquima metanefrogénico. Sin estos factores, este mesénquima formador de riñón muere. FGF2 también produce el mesénquima competente para responder a LIF.
16. El brote ureteral secreta LIF y WNT6 y estas proteínas inducen al mesénquima metanefrogénico competente a formar túbulos epiteliales. A medida que

ellos forman túbulos, las células secretan Wnt4, que promueve y mantiene su epitelización.

17. El mesénquima en condensación secreta factores paracrinos que median la ramificación del brote ureteral. Estos factores incluyen a BMP4 y TGF-ß2. La ramificación también depende del epitelio de la matriz extracelular.

Bibliografía citada

Aitkenhead, M., B. Christ, A. Eichmann, M. Feucht, D. J. Wilson and J. Wilting. 1998. Paracrine and autocrine regulation of vascular endothelial growth factor during tissue differentiation in the quail. Dev. Dynam. 212: 1-13.

Aoyama, H. and K. Asamoto. 2000. The developmentai fate of the rostral/caudal half of a somite for vertebra and rib formation: experimental confirmation of the resegmentation theory using chick-quail chimeras. Mech. Dev. 99: 71-82.

Armstrong, J. F., K. Pritchard-Jones, W. A. Bickmore, N. D. Hastie and J. B. L. Bard. 1992. The expression of the Wilms' tumor gene, WT- 1, in the developing mammalian embryo. Mech. Dev. 40: 85-97.

Ash, P. J., J. F. Loutit and K. M. S. Townsend. 1980. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. Nature 283: 669-670.

Aszódi, A., D. Chan, E. Hunziker, J. F. Bateman and R. Fassler.1998. Collagen II is essential for the removal of the notochord and the formation of intervertebral discs. J. Cell BioL 143: 1399-1412.

Barasch, J. and 10 others. 1999. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. Cell 99: 377-386.

Bard, J. B. L. and A. S. A. Ross. 1991. LIF, the ES cell inhibition factor, reversibly blocks nephrogenesis in cultured mouse kidney rudiments. Development 113: 193-198.

Bard, J. B. L., J. A. Davies, I. Karavanova, E. Lehtonen, H. Sariola and S. Vainio.1996. Kidney development: the inductive interactions. Semin. Cell. Dev. Biol. 7: 195-202.

Bard, J. B. L., A. Gordon, L. Sharp and W. Sellers. 2001. The early stages of nephron formation in the developing mouse kidney. J. Anat. 199: 385-392.

Bard, J. B. L. 2002. Growth and death in the developulg mammalian kidney: Signals, receptors, and conversations. BioEssays 24: 72-82.

Barnes, G. L., C. W. Hsu, B. D. Mariani and R. S. Tuan. 1997. Cloning and characterization of chicken paraxis: A regulator of paraxial mesoderm development and somite formation. Dev. Biol. 189: 95-111.

Baron, R., L. Neff, D. Louvard and P. J. Courtoy. 1985. Ceil mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing laeuna and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. J. Cell Biol. 101: 2210-2222.

Baron, R., L. Neff, C. Roy, A. Boisvert and M. Caplan. 1986. Evidence for a high and specific concentration of (Na^{+},K^{+}) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. Cell 46: 311-320.

Batourina, E. and 8 others. 2002. Distal ureter morphogenesis depends on epithelial cell remodeling mediated by vitamin A and Ret. Nature Genet. 32: 109-115.

Bergstrom, D. A. and S. J. Tapscott. 2001. Mole cular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. Mol. Cell. Biol. 21:2404-2412.

Bishop-Calame, S. 1966. Étude dexperimentale de l'organogenese du systéme l'embryon de poulet. Arch. Anat. Microc. Morphol. Exp. 55: 215-309.

Blair, H. C., A. J. Kahn, E. C. Crouch, J. J. Jeffrey and S. L. Teitelbaum. 1986. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. J. Cell. Biol. 102: 1164-1172.

Bloom, W. and D. W. Fawcett. 1975. Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Boettiger, D., M. Enomoto-Iwamoto, H. Y. Yoon, U. Hofer, A. S. Menko and R. Chiquet-Ehrismann. 1995. Regulation of integrin a5b1 affinity during myogenic differentiation. Dev. Biol. 169: 261-272.

Bouchard, M., A. Souabni, M. Mandler, A Neubuser and M. Busslinger. 2002. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. Genes De Brand-Saberi, B., J. Wilting, C., Ebensperger an B. Christ. 1996. The formation of somite compartments in the avian embryo. Int. J. Dev. Biol. 40 41 1- 420.

Brill, G., N. Kahane, C. Carmeli, D. von Schacll., Y.-A. Barde and C. Kalcheim. 1995. Epithelial mesenchymal conversion of dermatome progenitors requires neural tube-derived signals: Characterization of the role of neurotrophin-3 Development 121: 2583-2594.

Bruder, S. P. and A. I. Caplan. 1989. Celular and molecular events during embryonic bone develoment. Connect. Tiss. Res. 20: 65-71.

Bulman, M. P. and 9 others. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. Nature Genet. 24: 438-441.

Burgess, R., P. Cserjesi, K. L. Ligon and E. N. Olson. 1995. Paraxis: A basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. Dev. Biol. 168: 296-306.

Burgess, R., Rawls., D. Brown, A. Bradley and E. N. Olson. 1996. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. Nature 384: 570-573.

Chen, C.-M., N. Kraut, M. Groudine and H. Weintraub.1996. I-mf, a novel myogenic repres- sor, interacts with members of the MyoD family. Cell 86: 731-741.

Christ, B. and C. P. Ohrdahl.1995. Early stages of chick somite development. Anat. Embryol. 191: 381-396.

Cossu, G., R. Kelly, S. Tajbakhsh, S. Di Donna, E. Vivarelli and M. Buckingham. 1996a. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. Development 122: 429-437.

Cossu G., S. Tajbakhsh and M. Buckingham 1996b. How is myogenesis in\nitiated in the embryo? Trends Genet. 12:218-223.

Dale, J. K., M. Maroto, M.-L. Dequeant, M. Malaper, M. McGrew and O. Pour-

quie. 2003. Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. Nature 421: 275-278.

David, J. D., W. M. See and C. A. Higginbotham. 1981. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: Role of calcium influx preceding membrane union. Dev. Biol. 82: 297-307.

Davies, J. A., M. Lyon, J. Gallagher and D. R. Garrod. 1995. Sulphated proteoglycan is required for collecting duct growth and branching but not nephron formation during kidney development. Development 121: 1507-1517

Dickman, S. 1997. No bones about a genetic switch for bone development. Science 276: 1502.

Dietrich, S., F. R. Schubert, C. Healy, P. T., Sharpe and A. Lumsden. 1998. Specification of hypaxial musculature. Development 125: 2235-2249.

Dubrulle, J., M. J. McGrew and O. Pourquié. 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. Cell 106: 219-232.

Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L., Ridall and G. Karsenty. 1997. Osf2/Cbal: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89: 747-754.

Dudley, A. T., K. M. Lyons and E. J. Robertson. 1995. A requirement for bone morphogenesis protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev. 9: 2795-2807.

Dunwoodie, S. L., M. Clements, D. B. Sparrow, X. Sa, R. A. Conlon and R. S. P. Beddington. 2002. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene D113 are as sociated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. Development 129: 1795-1806.

Duong, L. T. and G. A. Rodan. 2001. Regulation of osteoclast formation and function. Rev. Endocr. Metab. Disorders. 2: 95-104.

Durbin, L. and 8 others. 1998. Eph signaling is required for segmentation and differentiation o the somites. Genes Dev. 12: 3096-3109.

Ekblom, P., I. Thesleff, L. Saxén, A. Miettine and R. Timpl.1983. Transferrin as a fetal growth factor: Acquisition of responsiveness related to embryonic induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2651-2655.

Ekblom, P. and 8 others. 1994. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. Development 120: 2003-2014.

Fan, C. M. and M. Tessier-Lavigne.1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. Cell 79: 1175-1186.

Gerber, H. P., T. H. Vu,. A. M. Ryan, J. Kowalski and Z. Werb. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification, and angiogenesis during endochondral bone formation. Nature Med. 5: 623-628.

Gluecksohn-Schoenheimer, S. 1943. The morphological manifestations of a dominant mutation in mice affecting tail and urogenital system. Genetics 28: 341-348.

Grobstein, C. 1955. Induction interaction in the development of the mouse metanephros. J. Exp. Zool. 130: 319-340.

Grobstein, C. 1956. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. Exp. Cell. Res. 10: 424-440.

Haigh, J. J., H. P. Gerber, N. Ferrara and E. F. Wagner. 2000. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen 2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. Development 127: 1445-1453.

Hall, B. K. 1988. The embryonic development of bone. Am. Sci. 76: 174-181.

Hall, B. K. and T. Miyake. 1995. Divide, accumulate, differentiate: Cell condensations in skeletal development revisited. Int. J. Dev. Biol. 39: 881-893.

Hatini, V., S. O. Huh, D. Herzlinger, V. C. Soares and E. Lai. 1996. Essential role of stromal morphogenesis in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of winged helix transcription factor, BF-2. Genes Dev. 10: 1467-1478.

Hatori, M., K. I. Klatte, C. C., Teixeira and I. M. Shapiro. 1995. Erld labeling studies of fragmented DNA in avian growth plate: Evidence for apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. J. Bone Miner. Res. 10: 1960-1968.

Hatta, K., S. Takagi, H. Fujisawa and M. Takeichi. 1987. Spatial and temporal expression of N-cadherin cell adhesion molecule correlated with morphogenetic processes of chicken embryo. Dev. Biol. 120: 218-227.

Horton, W. A.1990. The biology of bone growth. Growth Genet. Horm. 6(2): 1-3.

Huang, R., Q. Zhi, C. Schmidt, J. Wilting, B. Brand-Saberi and B. Christ. 2000. Sclerotomal origin of the ribs. Development 127: 527-532.

Ikeya, M. and S. Takada. 1998. Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. Development 125: 4969-4976.

Itaranta, P., Y. Lin, J. Perasaari, G. Roel, O. Destrée and S. Vainio. 2002. Wnt-6 is expressed in the ureter bud and induces kidney tubule development in vitro. Genesis 32: 259-268.

Johnson, R. L., E. Laufer, R. D. Riddle and C. Tabin. 1994. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. Cell 79: 1165-1173.

Jouve, C., I. Palmeirim, D. Henrique, J. Beckers, A. Gossler, D. Ish-Horowicz, and O. Pourquié. 2000. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. Development 127: 1421-1429.

Jouve, C., T. Imura and O. Pourquié. 2002. Onset of segmentation clock in the chick embryo: evidence for oscillations in the somite precursors in the primitive streak. Development 129: 1107-1117.

Kahn, A. J. and D. J. Simmons.1975. Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. Nature 258: 325-327.

Karavanov, A. A., I. Karavanova, A., Perantoni and I. B. Dawid. 1998. Expression pattern of the rat Lim-1 homeobox gene suggests a dual role during kidney development. Int. J. Dev. Biol. 42: 61 66.

Karavanova, I. D., L. F. Dove, J. H. Resau and A. O. Perantoni. 1996. Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme. Development 122: 4159-4167.

Karsenti, G. and E. F. Wagner. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. Dev. Cell 2: 389-406.

Kato, N. and H. Aoyama. 1998. Dermamyomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. Development 125: 3437-3443.

Kieny, M., A. Mauger and P. Segel. 1972. Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of

Capítulo 15 Lámina del mesodermo lateral y endodermo

El corazón de las criaturas es la base de la vida, el príncipe de todo, el sol del microcosmos, del que depende toda la vegetación, de ahí todo el vigor y la fuerza fluyen.
WILLIAM HARVEY (1628)

Blut is ein ganz besodrer saft. (La sangre es un jugo muy especial.)
WOLFGANG GOETHE (1805)

EN EL CAOS DE LA GUERRA CIVIL INGLESA, William Harvey, médico del rey y descubridor del blastodermo, se consoló con ver el corazón como un indiscutido soberano del cuerpo, mediante cuyo poder de orden divino se aseguran las leyes de crecimiento del organismo. Los embriólogos posteriores analizaron al corazón más como un sirviente que un soberano, el chambelán de la casa que asegura que los nutrientes lleguen al cerebro localizado apicalmente y a los músculos localizados periféricamente. En cualquier metáfora, el corazón, la circulación y el sistema digestivo fueron vistos como siendo absolutamente críticos para el desarrollo. Como Harvey (1651) persuasivamente sostuvo, el embrión de pollo debe formar su propia sangre sin ninguna ayuda de la gallina y esta sangre es crucial en el crecimiento embrionario. Cómo esto sucedía era un misterio. "¿Qué artífice puede crear la sangre cuando todavía no existe ningún hígado?", él escribió. La nutrición proporcionada por el huevo también fue primordial para Harvey. Su conclusión acerca del valor nutritivo del vitelo y de la albúmina fue que: "El huevo es, como si fuese un útero expuesto, donde hay una sustancia concluida como la representante y sustituta, o vicaria de los senos."

Este capítulo resumirá brevemente los mecanismos por los cuales el sistema circulatorio, el aparato respiratorio y el aparato digestivo surgen en el embrión amniota. Como se verá, la lámina del mesodermo lateral y el endodermo interactúan para crear los órganos circulatorio y digestivo.*

LÁMINA DEL MESODERMO LATERAL

Sobre los lados periféricos de las dos bandas de mesodermo intermedio se localizan las **láminas del mesodermo lateral** (véanse figs. 14-1 y 14-2). Cada lámina se separa horizontalmente en dos capas. La capa dorsal es el **mesodermo somático (parietal)**, que subyace al ectodermo y que junto con el ectodermo forman la **somatopleura**. La capa ventral es el **mesodermo esplácnico (visceral)**, que recubre al endodermo y que junto con el endodermo forman la **esplacnopleura** (fig. 15-1). El espacio entre estas dos capas se convierte en la cavidad corporal –el **celoma**– que se extiende desde la futura región del cuello hacia la parte posterior del cuerpo. Durante el desarrollo tardío, los celomas del lado derecho y del lado izquierdo se fusionan, y los pliegues del tejido se extienden desde el mesodermo somático, dividiendo al celoma en cavidades separadas. En mamíferos, el celoma es subdividido en ca-

* Algunos científicos piensan que el mesodermo y el endodermo eran originalmente una única capa germinal, el "mesendodermo," que llevaba a cabo todas las funciones. Recordar del capítulo 8 que lo que en vertebrados es un amplio territorio de células embrionarias es verdaderamente la progenie de un único "mesentoblasto" en muchos invertebrados. Las señales que regulan al mesentoblasto y a la totalidad del territorio mesodérmico y endodérmico en vertebrados pueden ser similares (Maduro y col. 2001; Rodaway y Patient 2001).

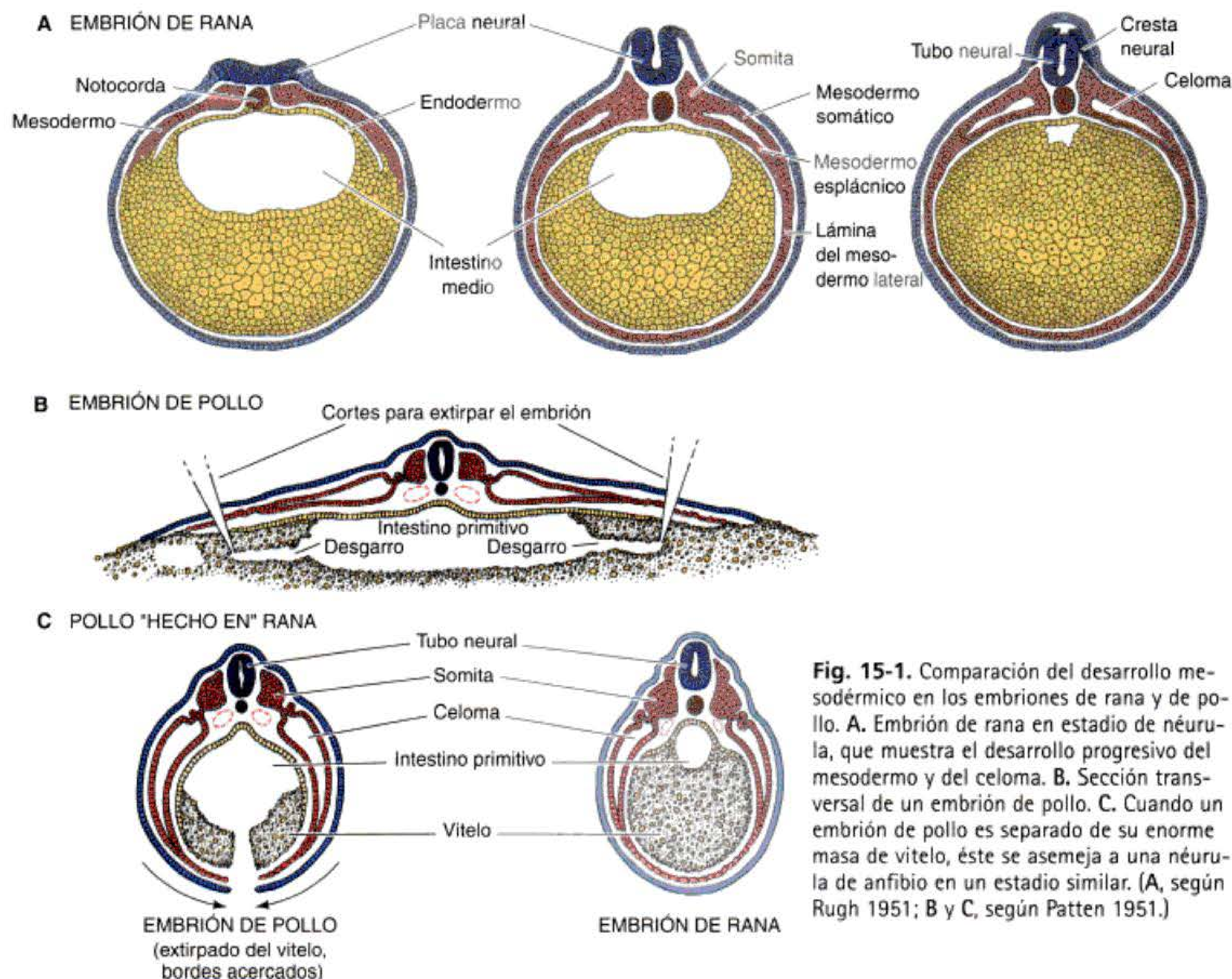


Fig. 15-1. Comparación del desarrollo mesodérmico en los embriones de rana y de pollo. **A.** Embrión de rana en estadio de néurula, que muestra el desarrollo progresivo del mesodermo y del celoma. **B.** Sección transversal de un embrión de pollo. **C.** Cuando un embrión de pollo es separado de su enorme masa de vitelo, éste se asemeja a una néurula de anfibio en un estadio similar. (**A**, según Rugh 1951; **B** y **C**, según Patten 1951.)

vidades **pleural**, **pericárdica** y **peritoneal**, que envuelven al tórax, el corazón y el abdomen, respectivamente. Los mecanismos para crear el revestimiento de estas cavidades corporales desde la lámina del mesodermo lateral han cambiado poco durante la evolución de los vertebrados, y el desarrollo del mesodermo del pollo puede compararse con estadios similares de los embriones de rana (fig. 15-1).

> SITIO WEB 15.1 **Formación del celoma (Coelom formation).** La formación del celoma es fácilmente visualizada por animaciones. La animación presentada aquí muestra la expansión del mesodermo durante el desarrollo del pollo.

El corazón

El sistema circulatorio es uno de los grandes logros de la lámina del mesodermo lateral. Consiste en un corazón, células sanguíneas y un complicado sistema de vasos sanguíneos; el sistema circulatorio proporciona los nutrientes al embrión de vertebrado en desarrollo. El sistema circulatorio es la primera unidad funcional en el embrión en desarrollo y el corazón es el primer órgano funcional. El corazón de vertebrado se origina de dos regiones de mesodermo esplácnico –uno sobre cada lado del cuerpo– que interactúan con tejidos adyacentes para ser especificadas para el desarrollo cardíaco.

> VADE MECUM[2] **Desarrollo cardíaco temprano (Early heart development).** El corazón de los vertebrados comienza a funcionar temprano en su desarrollo. Podrá observarlo en películas del embrión de pollo vivo en estadios tempranos cuando el corazón es poco más que un tubo con forma de asa (asa cardíaca).
> **[Hacer clic sobre Chick-Late]**

Especificación del tejido cardíaco y fusión de los primordios cardíacos

En vertebrados amniotas, el embrión es un disco aplanado y la lámina del mesodermo lateral no rodea completamente al saco vitelino. Las células cardíacas presuntivas se originan en la línea primitiva temprana, justo posterior al nódulo de Hensen y se extienden cerca de la mitad del camino hacia abajo en su longitud. Estas células migran

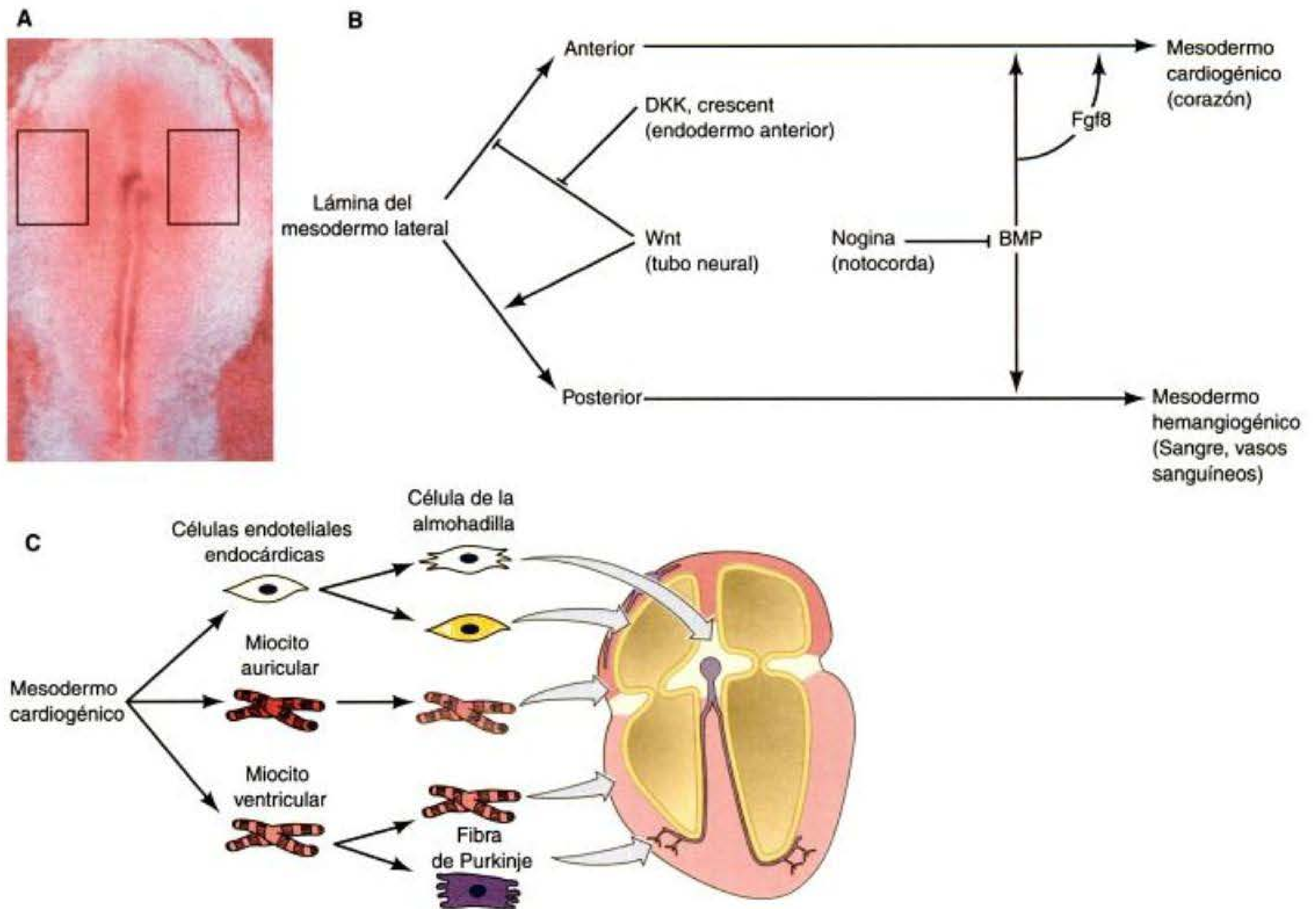


Fig. 15-2. Células que forman el corazón del embrión de pollo. **A.** Se forman dos regiones simétricas de mesodermo cardiogénico (formador de corazón) en el embrión de pollo que está gastrulando, determinadas al seguir individualmente a las células marcadas tratadas con Dil y mediante la observación de los patrones de expresión de genes particulares como α-actina del músculo liso. **B.** Resumen de las interacciones inductivas que están involucradas en las vías de Wnt y BMP, y que permiten la generación de los linajes cardíaco y sanguíneo que forman la lámina del mesodermo lateral. **C.** El mesodermo cardiogénico contiene los precursores de tres tipos celulares del endocardio y del miocardio. El endocardio proporciona el revestimiento endotelial del corazón así como las células de las almohadillas que forman las válvulas. Los miocitos auriculares del miocardio y los miocitos ventriculares (algunos de los que llegan a ser fibras de conducción de Purkinje) también son generados por el mesodermo cardiogénico. Las células de la cresta neural y el endotelio de los vasos cardíacos son especificados separadamente en diferentes localizaciones. (**A**, según Redkar y col. 2001; **C**, según Mikawa 1999.)

a través de la línea primitiva y forman dos grupos de células mesodérmicas laterales al (y al mismo nivel del) nódulo de Hensen (fig. 15-2A; Colas y col. 2000; Redkar y col. 2001). Estos grupos de células son denominados el **mesodermo cardiogénico**. Las células que forman la musculatura auricular y ventricular, las células de las almohadillas de las válvulas, de las fibras de conducción de Purkinje y del revestimiento endotelial del corazón son generadas desde estos dos grupos (Mikawa 1999).

ESPECIFICACIÓN DE LOS PRECURSORES CELULARES CARDÍACOS. La especificación de las células mesodérmicas cardiogénicas es inducida por el endodermo adyacente al corazón mediante las vías de señalización de BMP y FGF. El corazón no se forma si se extirpa el endodermo anterior. Además, el mesodermo aislado desde esta región formará músculo cardíaco cuando es combinado con endodermo anterior, pero no lo hará si es combinado con endodermo posterior (Schultheiss y col. 1995; Nascone y Mercola 1995). Parece que las proteínas Wnt desde el tubo neural, especialmente Wnt3a y Wnt8, *inhiben* la formación del corazón y *promueven* la formación de células sanguíneas. Sin embargo, el endodermo anterior produce inhibidores de Wnt tales como Cerberus, Dickkopf y Crescent, que evitan que las proteínas Wnt se unan a sus receptores. Los BMP desde el endodermo promueven el desarrollo cardíaco y sanguíneo, y pueden ser bloqueados por Nogina y cordina desde la notocorda. Las BMP endodérmicas también inducen la síntesis de FGF8 en el endodermo directamente por debajo del mesodermo cardiogénico, y FGF8 parece ser crítico para la expresión de proteínas cardíacas (Alsan y Schultheiss 2002). En ese sentido, las células precursoras cardíacas son especificadas en los lugares donde las BMP (mesodermo lateral y endodermo) y antagonistas de Wnt (endodermo anterior) coinciden (fig. 15-2B; Marvin y col. 2001; Schneider y Mercola 2001; Tzahor y Lassar 2001).

MIGRACIÓN DE LOS PRECURSORES CELULARES CARDÍACOS. Cuando el embrión de pollo tiene solamente 18 a 20 horas, las células cardíacas presuntivas se mueven hacia anterior entre el ectodermo y el endodermo hacia la

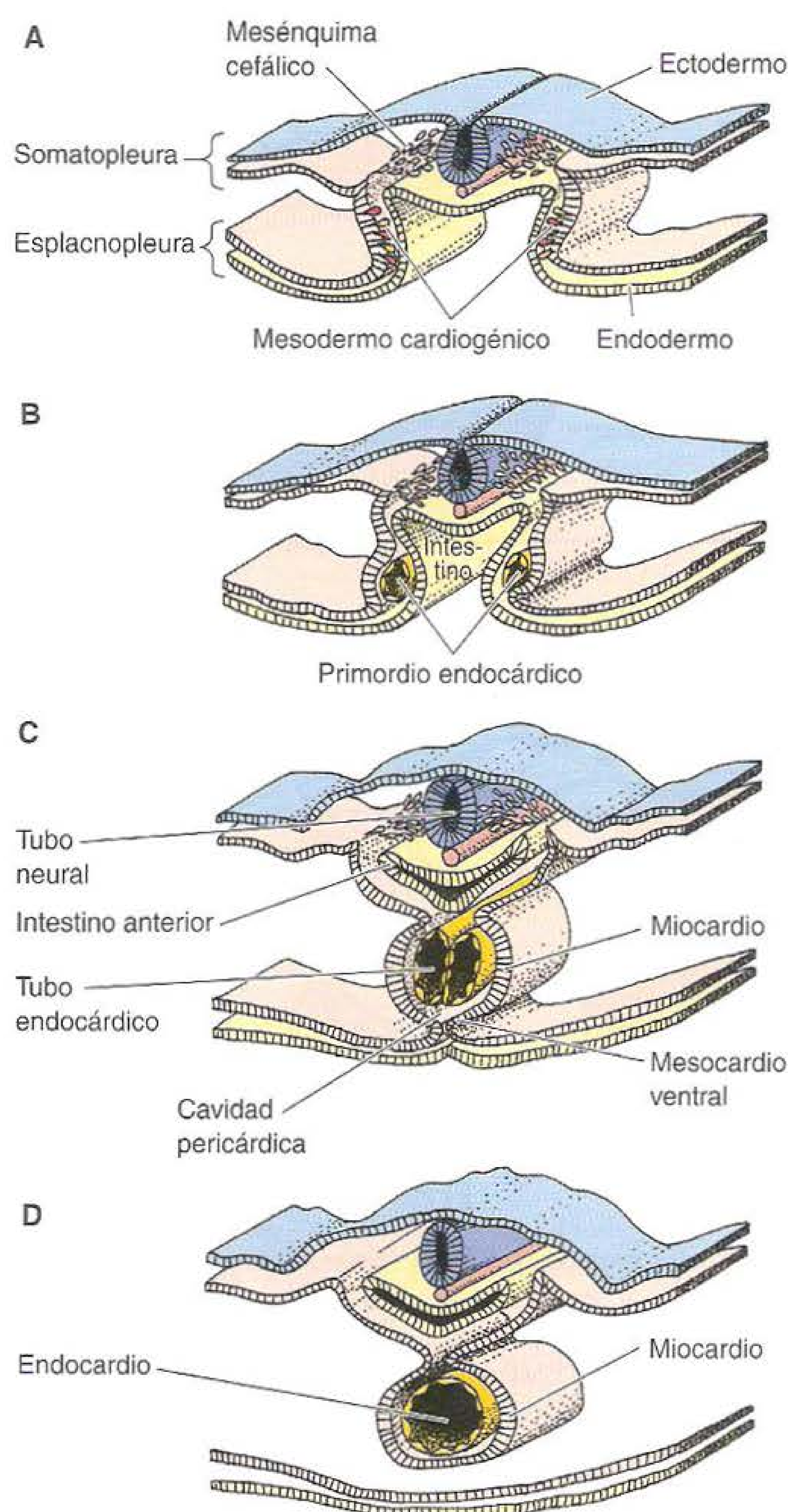


Fig. 15-3. Formación del corazón del pollo desde la hoja esplácnica del mesodermo lateral. El endocardio forma el revestimiento interno del corazón, el miocardio forma el músculo cardíaco y el epicardio finalmente cubrirá el corazón. Secciones transversales a través de la región que forma el corazón del embrión de pollo son mostradas a A, 25 horas, B, 26 horas, C, 28 horas y D, 29 horas. (Según Carlson 1981.)

línea media del embrión, y se mantienen en estrecho contacto con la superficie endodérmica (Linask y Lash 1986). Cuando estas células alcanzan las paredes laterales del tubo digestivo anterior, la migración se detiene. La direccionalidad de esta migración parece ser proporcionada por el endodermo del intestino anterior. Si el endodermo de la región cardíaca es rotado con respecto al resto del embrión, la migración de las células del mesodermo cardiogénico se invierte. Se piensa que el componente endodérmico responsable de este movimiento es un gradiente de concentración anteroposterior de fibronectina. Los anticuerpos contra fibronectina detienen la migración, mientras que los anticuerpos contra otros componentes de la matriz extracelular no lo hacen (Linask y Lash 1988a,b).

En el pollo, el intestino anterior se forma por el plegamiento hacia dentro del mesodermo esplácnico (fig. 15-3A, B). Este movimiento produce el acercamiento de los dos tubos cardíacos. El origen bilateral del corazón puede ser demostrado al evitar quirúrgicamente la unión de la lámina del mesodermo lateral (Gräper 1907; De Haan 1959). Esta manipulación resulta en una anomalía denominada **cardia bífida** (dos corazones), en la que se forman dos corazones separados, uno a cada lado del cuerpo (fig. 15-4A). Dentro del tubo común se encuentran dos endocardios por un breve tiempo, pero éstos también se fusionarán.

En el pez cebra, las células cardíacas precursoras migran activamente desde los bordes laterales hacia la línea media. Varias mutaciones que afectan la diferenciación del endodermo alteran este proceso, indicando que, como en el pollo, el endodermo es crítico para la migración de los precursores cardíacos. Una mutación particularmente interesante del pez cebra es denominada ***miles apart*** (millas de separación). Este fenotipo se asemeja al cardia bífida vista en los embriones de pollo manipulados experimentalmente. El gen *miles apart* codifica un receptor para una molécula de esfingolípido de la superficie celular y es expresado en el endodermo a cada lado de la línea media (fig. 15-4B,C; Kupperman y col. 2000).

DIFERENCIACIÓN CELULAR INICIAL. La vía de BMP (ante la ausencia de señales de Wnt) es crítica en la inducción de la síntesis del factor de transcripción **Nkx2-5** en el mesodermo cardiogénico en migración* (fig. 15-5; Komuro e Izumo 1993; Lints y col. 1993; Sugi y Lough 1994; Schultheiss y col. 1995; Andrée y col. 1998). Nkx2-5 es crítico en la instrucción del mesodermo para convertirse en tejido cardíaco, y activa la síntesis de otros factores de transcripción (especialmente miembros de las familias GATA y MEF2). Al trabajar juntos, estos factores de transcripción activan la expresión de genes que codifican proteínas específicas de músculo cardíaco (como la actina cardíaca, el factor natriurético auricular y las cadenas pesadas de la α-miosina). La especificación de las células cardíacas se produce gradualmente, de modo anteroposterior a través de los campos cardiogénicos, de modo tal que las células ventriculares futuras llegan a ser especificadas antes que lo hagan las futuras células auriculares (Markwald y col. 1998; Srivastava y Olson 2000).

La diferenciación celular se produce independientemente en dos primordios formadores de corazón que están migrando el uno hacia el otro. A medida que ellos migran, las células mesodérmicas ventrales comienzan a expresar cadherina-N sobre sus ápices, separándose de las células del mesodermo dorsal y uniéndose para formar un epitelio. Esta unión llevará a la formación de la **cavidad pericárdica**, el saco en el que es formado el co-

* El factor de transcripción de homeodominio Nkx2-5 es homólogo al factor de transcripción Tinman que es activo en especificar el tubo cardíaco de *Drosophila*. Además, ni Tinman ni Nkx2-5 solos son suficientes para completar el desarrollo cardíaco en sus respectivos organismos. Ratones que carecen de Nkx2-5 comienzan a formar sus tubos cardíacos, pero el tubo falla en engrosarse o en formar el asa (Lyons y col. 1995). Los seres humanos con una mutación en uno de sus genes *NKX2-5* tienen anomalías cardíacas congénitas (Schott y col. 1998).

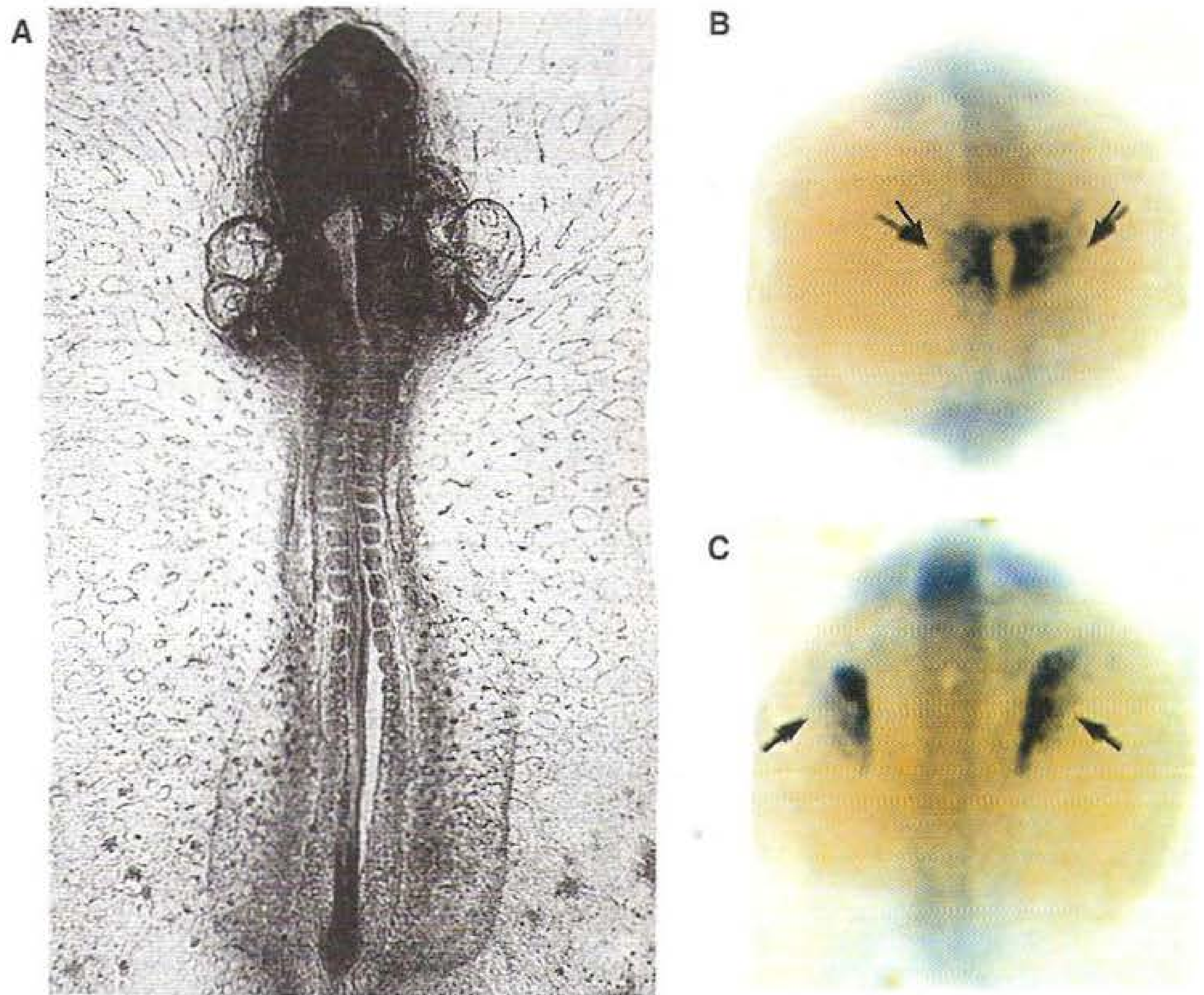


Fig. 15-4. Migración del primordio cardíaco. **A.** *Cardia bífida en un embrión de pollo, causado por la sección quirúrgica de la línea media ventral, que impide de este modo la fusión de los dos primordios cardíacos.* **B.** Tipo salvaje y **C**, *mutante miles apart*, teñido con sondas para la cadena liviana de miosina cardíaca. En el mutante *miles apart* hay carencia de migración. (A, microfotografía cortesía de R. L. DeHaan; B, C, según Kupperman y col. 2000, cortesía de Y. R. Didier.)

razón (Linask 1992). Una pequeña población de células luego regula en menos a la cadherina-N y se deslamina del epitelio para formar el **endocardio**, el revestimiento del corazón que es continuo con el de los vasos sanguíneos (fig. 15-3A, B).* Las células epiteliales forman el **miocardio** (Manasek 1968; Linask y Lash 1993; Linask y col. 1997), que dará origen al músculo cardíaco que bombeará por el tiempo de vida del organismo. Las células endocardíacas producen la mayoría de las válvulas del corazón, secretan las proteínas que regulan el crecimiento miocárdico y regulan la localización del tejido nervioso en el corazón.

FUSIÓN Y LATIDOS CARDÍACOS INICIALES. La fusión de los dos primordios cardíacos se produce casi a las 29 horas en el desarrollo del pollo y a las 3 semanas en la gestación humana (véase fig. 15-3C,D). El miocardio se une para formar un tubo único. Los dos endocardios se localizan dentro de este tubo común por un breve tiempo, pero finalmente también se fusionan. Las porciones posteriores sin fusionar del endocardio llegarán a ser las aperturas de las **venas vitelinas** hacia el corazón (figs. 15-5 y 15-6). Estas venas transportarán nutrientes desde el saco vitelino hacia el **seno venoso**, la región posterior donde se fusionan las dos venas principales. La sangre luego pasa a través de una trampa con forma de válvula hacia la región auricular del corazón. Las contracciones del **tronco arterioso** aumentan la velocidad de la sangre hacia la aorta.

La fusión podría iniciar (o al menos ser simultánea con) una segunda ronda de acontecimientos de diferenciación. Los mRNA para ciertas proteínas específicas de músculo cardíaco pueden haber sido transcritas tempranamente; pero ellas pueden ser mantenidas sin ser traducidas hasta la fusión de los dos rudimentos cardíacos en un tubo (Colas y col. 2000).

Las pulsaciones del corazón comienzan mientras el par de primordios todavía se está fusionando. Las células musculares cardíacas desarrollan su propia capacidad hereditaria para contraerse y células cardíacas aisladas de embriones de rata o de pollo de 7 días continúan latiendo en placas de petri (Harary y Farley 1963; Dehaan 1967; Imanaka-Yoshida y col. 1998). Las pulsaciones del corazón del pollo comienzan a las 33 horas del desarrollo (mientras el par de primordios se está fusionando). Las pulsaciones se hacen posibles por la presencia de la bomba intercambiadora sodio-calcio en la membrana celular muscular; cuando se inhibe esta función del canal se evita el latido cardíaco desde el comienzo (Wakimoto y col. 2000; Linask y col. 2001). Finalmente, la ritmicidad de los latidos cardíacos llega a ser coordinada por el seno venoso. El impulso eléctrico aquí generado inicia ondas de contracción muscular a lo largo del corazón tubular. De este modo, el corazón puede bombear sangre incluso antes de que se haya completado su intrincado sistema de válvulas. Los estudios de las mutaciones de los canales de calcio de las células cardíacas han implicado a estos canales en la función de marcapaso (Rottbauer y col. 2001; Zhang y col. 2002).

FORMACIÓN DEL ASA CARDÍACA Y DE LAS CÁMARAS CARDÍACAS. En los embriones de pollo de 3 días y en los embriones humanos de 5 semanas, el corazón es un tubo de dos cámaras, con una aurícula y un ventrículo (fig. 15-6). En el embrión de pollo, un ojo sin ayuda puede ver el destacable ciclo de la sangre cuando ingresa a la cámara inferior y es bombeada fuera a través de la aorta. La formación del asa cardíaca convierte la polaridad original anteropos-

* La población celular endocárdica es distinta de la población celular miocárdica incluso antes de la gastrulación. Los estudios de linaje celular que utilizan marcadores retrovirales muestran que los clones de las células miocárdicas durante los estadios previos a la línea primitiva no tienen células endocárdicas y que ningún clon tiene células miocárdicas. Por lo tanto, el mesodermo cardiogénico ya tiene dos poblaciones de células comprometidas (Cohen-Gould y Mikawa 1996).

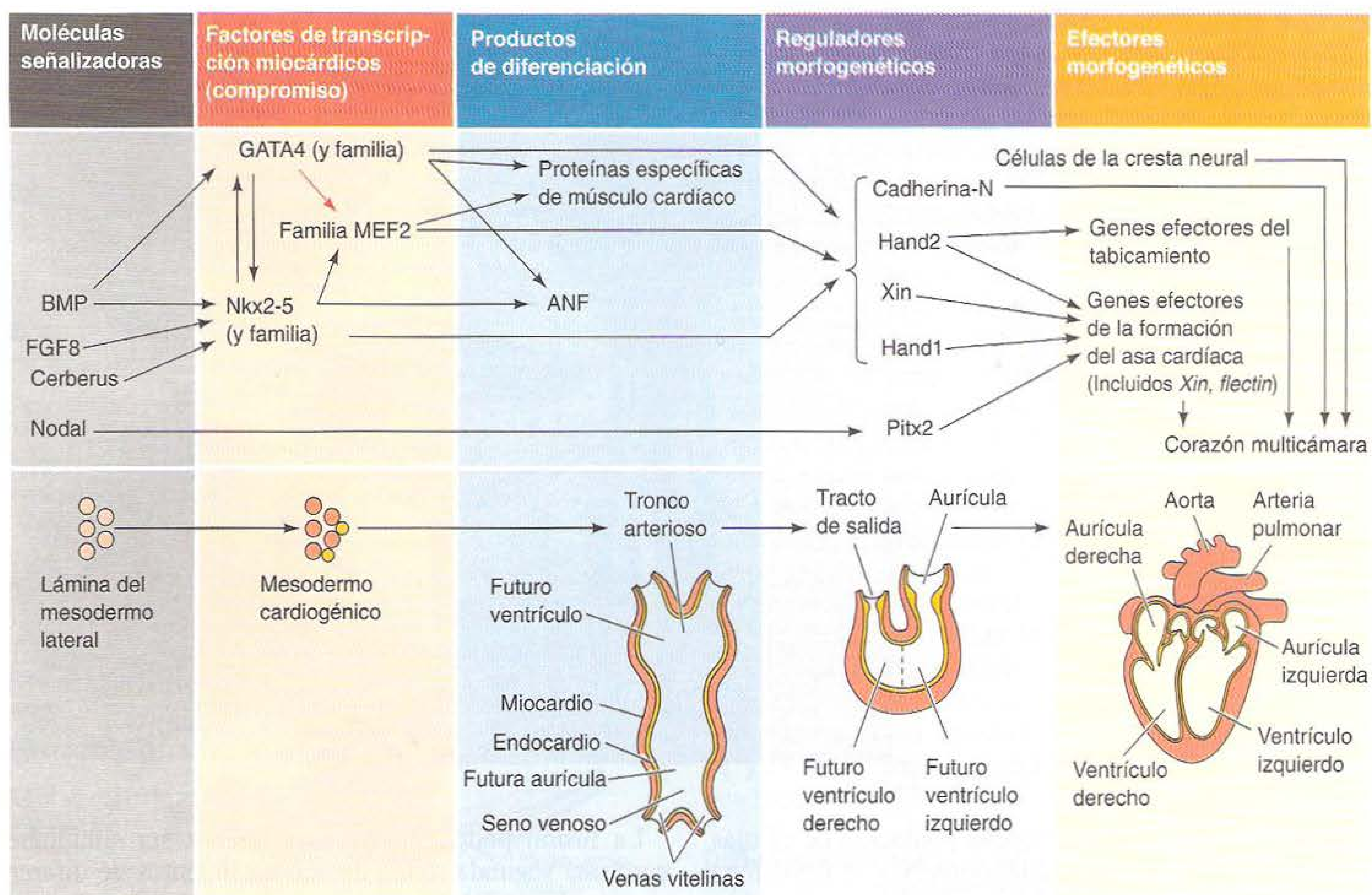


Fig. 15-5. Cascada del desarrollo cardíaco. Puede hacerse una correlación entre los estadios morfológicos y los factores de transcripción presentes en el núcleo de los precursores celulares cardíacos. Los cardioblastos son las células precursoras cardíacas comprometidas que contienen las proteínas de la familia Nkx2-5 y GATA. Estas proteínas convierten los cardioblastos hacia miocardiocitos (células musculares cardíacas), que producen proteínas específicas de músculo cardíaco. Estos miocardiocitos se agrupan para formar el tubo cardíaco. Bajo la influencia de las proteínas Hand, Xin y Pitx2, se forma el asa cardíaca y comienza la formación de las cámaras cardíacas.

terior del tubo cardíaco en una polaridad derecha-izquierda vista en el organismo adulto. Cuando se completa la formación del asa cardíaca (curvamiento cardíaco), la porción del tubo cardíaco destinada a convertirse en ventrículo derecho se localiza en una posición un poco más ventral a la porción que será el ventrículo izquierdo.

La formación del asa cardíaca es dependiente de las proteínas que establecen el patrón izquierda-derecha (Nodal-Lefty-2) discutido en el capítulo 11. Dentro del primordio cardíaco, la proteína Nkx2-5 regula a los factores de transcripción Hand1 y Hand2. Aunque las proteínas Hand parecen ser sintetizadas en todo el tubo cardíaco temprano, Hand1 se restringe al futuro ventrículo izquierdo, y Hand2 al derecho, a medida que comienza la formación del asa cardíaca. Sin estas proteínas, falla la producción normal del asa, debido a que falla la formación apropiada de los ventrículos* (Srivastava y col. 1995; Biben y Harvey 1997). El factor de transcripción Pitx2, activado solamente en el lado izquierdo de la lámina del mesodermo lateral (y finalmente en el lado izquierdo del tubo cardíaco), también es crítico para la formación apropiada del asa cardíaca. Pitx2 parece regular la expresión temporal de proteínas tales como la proteína **flectina** de la matriz extracelular, que regula la tensión física de los tejidos cardíacos sobre los diferentes lados (Tsuda y col. 1996; Linask y col. 2002). Los factores de transcripción Nkx2-5 y MEF2C también activan al gen *Xin*, cuyo producto proteico, Xin ("corazón" en chino), puede mediar los cambios citoesqueléticos esenciales para la formación del asa cardíaca (Wang y col. 1999).

SITIO WEB 15.2 **Factores de transcripción y formación del corazón (Transcription factors and heart formation)**. La formación del corazón y de las células sanguíneas es presidida por varios factores de transcripción cuyas combinaciones permiten formar las diferentes partes del corazón y el desarrollo de los diferentes tipos de células sanguíneas.

La separación de la aurícula del ventrículo es efectuada por varios factores de transcripción que se restringen a la porción anterior o posterior del tubo cardíaco (véase fig. 15-6; Bao y col. 1999; Bruneau y col. 1999; Wang y col. 1999). Esta separación es llevada a cabo cuando las

* El pez cebra, con solo ventrículo, tiene solo un tipo de proteína Hand. Cuando el gen que codifica esa proteína es mutado, la totalidad de la porción ventricular del corazón falla en formarse (Srivastava y Olson, 2000). Además, los agentes no genéticos también son críticos en la formación normal del corazón del pez cebra. Ante la ausencia de alta presión de flujo sanguíneo, el posicionamiento del corazón, la formación de la cámara y el desarrollo de la válvula son afectados (Hove y col., 2003).

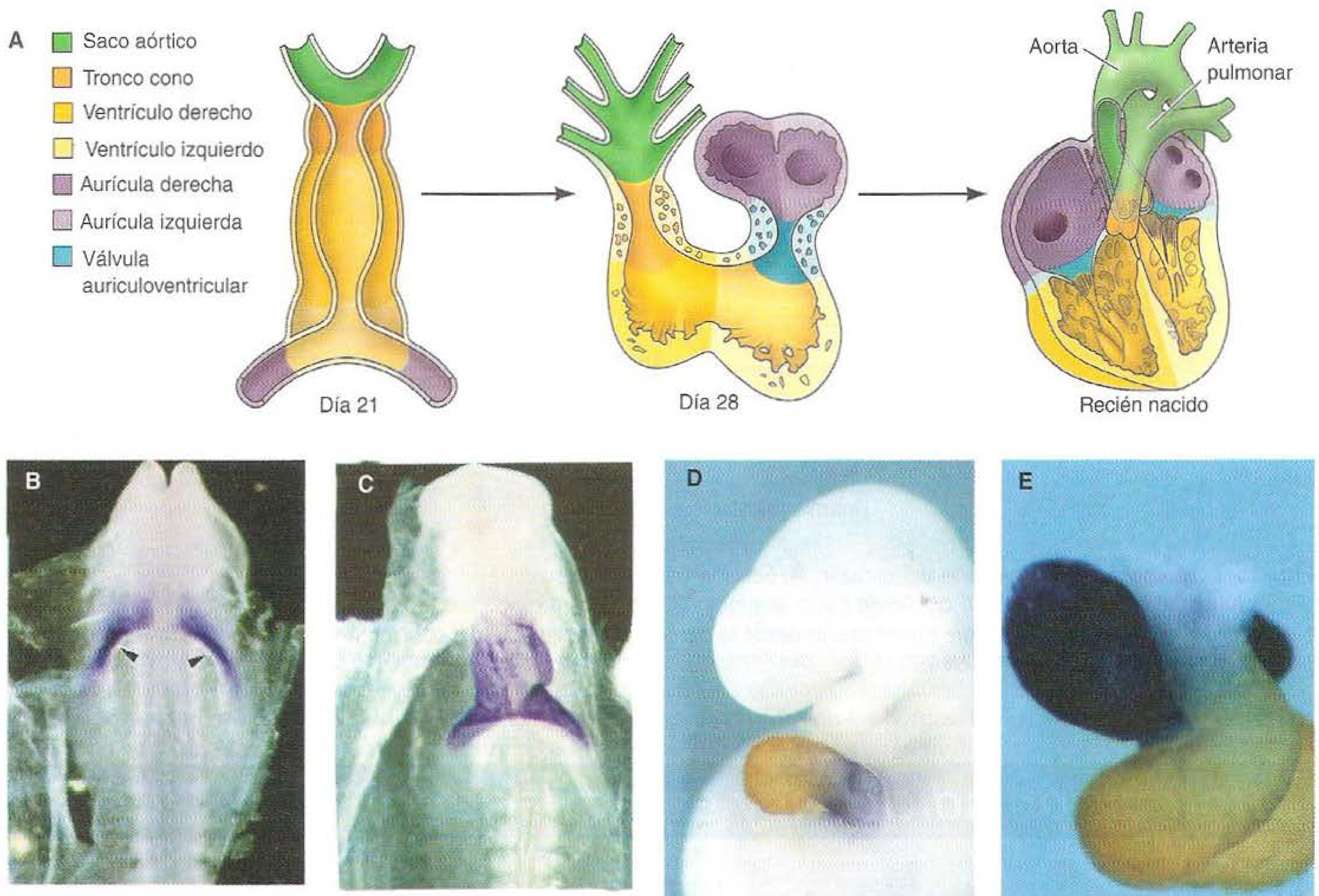


Fig. 15-6. Formación del asa y de la cámara cardíaca. **A.** Gráfico esquemático de la morfogénesis cardiaca en humanos. Sobre el día 21, el corazón es un tubo de una sola cámara. La especificación de las regiones del tubo se muestra en diferentes colores. Hacia el día 28, se ha formado el asa cardíaca, situando a la aurícula presuntiva anterior a los ventrículos presuntivos. **B, C.** Expresión de *Xin* en la fusión de los primordios cardíacos derecho e izquierdo. Las células destinadas a formar el miocardio se muestran mediante la tinción para el mensajero *Xin*, cuyo producto proteico es esencial para la formación del asa del tubo cardíaco. **B.** Estadio 9 (Estadios según Hamburguer y Hamilton -HH) de una néurula del pollo, en la que la expresión de *Xin* (violeta) es vista en dos campos simétricos formadores de corazón (flechas). **C.** Estadio 10 (HH) del embrión de pollo, que muestra la fusión de las regiones formadoras de corazón previo a la formación del asa cardíaca. **D, E.** La especificación de la aurícula y de los ventrículos se produce incluso antes de la formación del asa cardíaca. La aurícula y los ventrículos del embrión de ratón tienen distintos tipos de proteínas de miosina, que les permiten ser teñidos de modo diferente. En estas fotografías, la miosina auricular está teñida de azul, mientras que la miosina ventricular está teñida de naranja. **D.** En el corazón tubular (previo a la formación del asa cardíaca), las dos miosinas (y sus tinciones respectivas) se superponen en el canal auriculoventricular uniendo las futuras regiones del corazón. **E.** Según la formación del asa cardíaca, la tinción azul oscuro se observa en la aurícula definitiva y en el tracto de entrada, mientras que la tinción naranja se observa en los ventrículos. La región sin teñir por arriba de los ventrículos es el tronco arterioso, que llega a ser separado en las arterias aorta y pulmonar. (A, según Srivastava y Olson 2000; B, C, Wang y col. 1999, fotografía cortesía de J. J.-C. Lin; E, F, según Xavier-Neto y col. 1999, fotografías cortesía de N. Rosenthal.)

células del miocardio producen un factor (probablemente el factor de crecimiento transformante ß3) que hace que las células del endocardio adyacente se separen y entren a la "gelatina cardíaca" rica en hialuronato entre las dos capas (Markwald y col. 1977; Potts y col. 1991). En humanos, estas células forman una **almohadilla endocárdica** que divide al tubo en los canales auriculoventricular derecho e izquierdo (fig. 15-7). Mientras tanto, la aurícula primitiva es separada por dos **tabiques** que crecen ventralmente hacia la almohadilla endocárdica. Sin embargo, los tabiques tienen aberturas de modo tal que la sangre todavía puede cruzar de un lado al otro. Este cruce de la sangre es necesario para la supervivencia del feto antes de que se haya establecido una circulación pulmonar funcional. Sin embargo, en la primera respiración, la apertura del tabique se cierra y se establecen los circuitos circulatorios derecho e izquierdo (véase Información adicional y especulaciones). Con la formación del tabique (que normalmente se produce en la séptima semana del desarrollo humano), el corazón es una estructura de cuatro cámaras con la arteria pulmonar conectada al ventrículo derecho y la aorta conectada al ventrículo izquierdo.

Formación de los vasos sanguíneos

Aunque el corazón es el primer órgano funcional del cuerpo, éste no comienza a bombear hasta que el sistema vascular del embrión ha establecido su primer circuito circulatorio. En lugar de brotar desde el corazón, los vasos sanguíneos se forman independientemente, conectán-

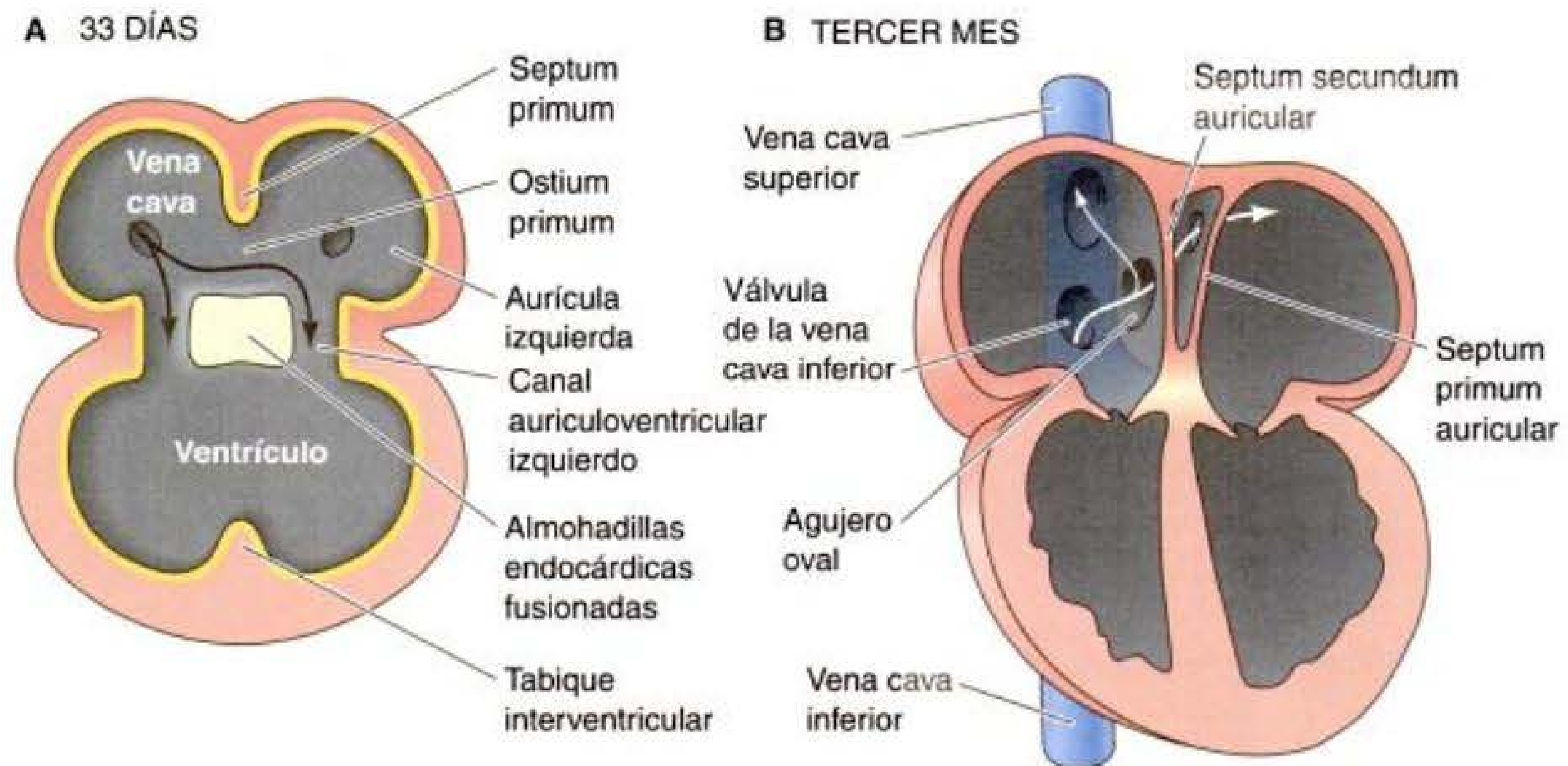


Fig. 15-7. Formación de las cámaras del corazón. **A.** Sección transversal esquemática del corazón humano de 4,5 semanas. Los tabiques auricular y ventricular están creciendo hacia la almohadilla endocárdica. **B.** Sección transversal del corazón humano durante el tercer mes de gestación. La sangre puede cruzar desde la derecha a la izquierda del corazón a través de aberturas en los tabiques primario y secundario. (Según Larsen 1993.)

Información adicional y especulaciones

Redireccionamiento del flujo sanguíneo en los mamíferos recién nacidos

Aunque el feto de mamífero en desarrollo comparte con el adulto la necesidad de obtener oxígeno y nutrientes para sus tejidos, la fisiología del feto difiere espectacularmente de la del adulto. La principal entre las diferencias es que el feto carece de pulmones e intestinos funcionales. Todo su oxígeno y nutrientes deben venir de la placenta. Esta observación da origen a dos preguntas. Primera, ¿cómo obtiene el feto oxígeno de la sangre materna? Y segunda, ¿cómo es redirigida la circulación sanguínea hacia los pulmones una vez que el cordón umbilical es cortado y la respiración se vuelve necesaria?

Circulación embrionaria humana

El sistema circulatorio humano es una modificación de la utilizada en otros amniotas, tales como aves y reptiles. El sistema circulatorio hacia y desde el embrión de pollo y el saco vitelino se muestra en la figura 15-8. La sangre bombeada a través de la aorta dorsal pasa a través de los arcos aórticos y hacia el embrión. Algo de su sangre deja el embrión a través de las arterias vitelinas y entran al saco vitelino. Nutrientes y oxígeno son absorbidos desde el saco vitelino y la sangre retorna a través de las venas vitelinas para reingresar al corazón a través del seno venoso.

Los embriones de mamíferos obtienen nutrientes y oxígeno de la placenta. Por lo tanto, aunque el embrión tiene vasos análogos a las venas vitelinas, el principal suministro de nutrientes y oxígeno viene de la vena umbilical, que une al embrión con la placenta (fig. 15-9; véanse fig. 11-36 y portada). Esta vena, que trae sangre oxigenada y nutrientes hacia el embrión, es derivada de lo que sería la vena vitelina derecha en las aves. La arteria umbilical, que transporta los desechos a la placenta, es derivada de lo que sería la arteria alantoidea del pollo. Ésta se extiende desde la porción caudal de la aorta y procede a lo largo de la alantoides y luego sale hacia la placenta.

Hemoglobina fetal

La solución al problema del feto de obtener oxígeno desde la sangre de su madre involucra el desarrollo de una hemoglobina fetal especializada. La hemoglobina en las células sanguíneas rojas fetales difiere levemente de la de los corpúsculos del adulto. Dos de cuatro péptidos –las cadenas alfa (α)– que producen cadenas de hemoglobina fetal y del adulto son idénticas, pero la hemoglobina del adulto tiene dos cadenas beta (β), mientras que el feto tiene dos cadenas (γ) (fig. 15-10). Las cadenas β unen el regulador natural difosfoglicerato, que ayuda en la descarga de oxígeno. Las isoformas de la cadena γ no unen difosfoglicerato tan bien y por esta razón tienen una mayor afinidad por el oxígeno. En el ambiente de bajo nivel de oxígeno de la placenta, el oxígeno es liberado de la hemoglobina del adulto. En este mismo ambiente, la hemoglobina fetal no libera oxígeno, sino que se une a éste. Esta pequeña diferencia en la afinidad de oxígeno media la transferencia de oxígeno de la madre al feto. Dentro del feto, la mioglobina de los músculos fetales tiene incluso una afinidad mayor por el oxígeno, entonces las moléculas de oxígeno pasan desde la hemoglobina fetal al músculo fetal. La hemoglobina fetal no es perjudicial para el recién nacido y en humanos el reemplazo de células sanguíneas que

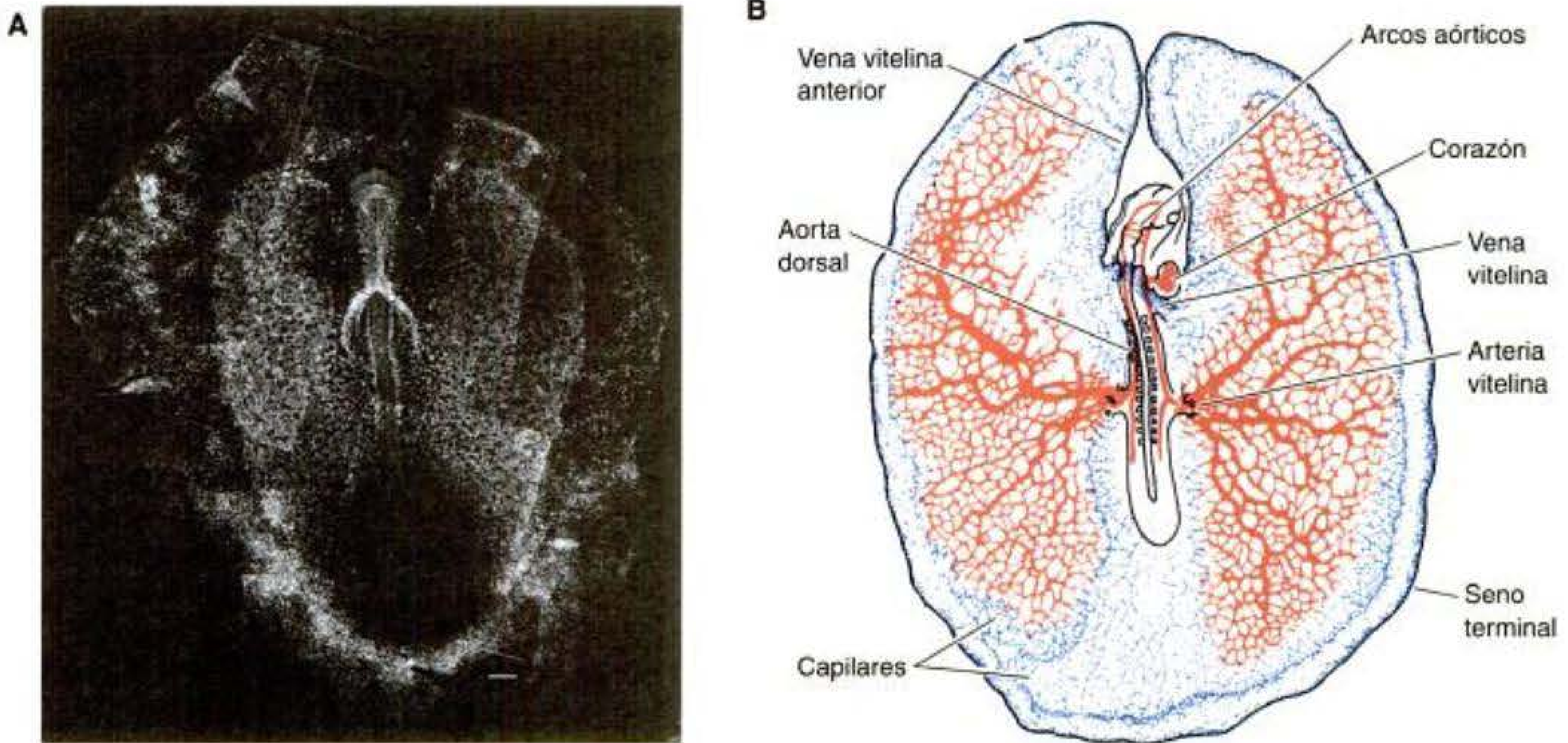


Fig. 15-8. Sistema circulatorio del embrión temprano de ave. **A.** Construcción de la vasculatura en un embrión de codorniz de 7 somitas, teñido con un anticuerpo fluorescente que reconoce a las células endoteliales. Los islotes sanguíneos, que formarán los vasos sanguíneos y las células sanguíneas, pueden ser observados en los bordes. **B.** Sistema circulatorio de un embrión de pollo de 44 horas. Esta vista muestra a las arterias en color; las venas están punteadas. El seno terminal es el límite externo del sistema circulatorio y el sitio de generación de células sanguíneas. (Véase además fig. 1-2.) (**A**, montaje fotográfico de Pardanaud y col. 1987, cortesía de F. Dieterlen-Lièvre; **B**, según Carlson 1981.)

contienen hemoglobina fetal con células sanguíneas que contienen hemoglobina del adulto no se completa hasta cerca de los 6 meses después del nacimiento. (Las bases moleculares para este cambio en la globina fueron discutidas en el capítulo 5.)

Desde la circulación fetal a la del recién nacido

Una vez que el feto no obtiene más su oxígeno de la madre, ¿cómo reestructura su circulación para obtener oxígeno desde sus propios pulmones? Durante el desarrollo fetal, una abertura –el **conducto arterioso**– desvía sangre desde la arteria pulmonar hacia la aorta (y por lo tanto hacia la placenta). Debido a que la sangre no retorna desde las venas pulmonares en el feto, los mamíferos en desarrollo tienen que tener algún otro modo para obtener sangre en el ventrículo izquierdo a ser bombeada. Esto es llevado a cabo por el **agujero oval**, una abertura en el tabique (septum) que separa la aurícula derecha de la izquierda. La sangre puede entrar a la aurícula derecha, pasar a través del agujero hacia la aurícula izquierda y luego entrar al ventrículo izquierdo (fig. 15-11). Cuando se produce la primera respiración, se incrementa la presión sanguínea en el lado izquierdo del corazón. Esta presión cierra el tabique sobre el agujero oval, separando de este modo las circulaciones sistémica y pulmonar. Además, la disminución en las prostaglandinas ex-

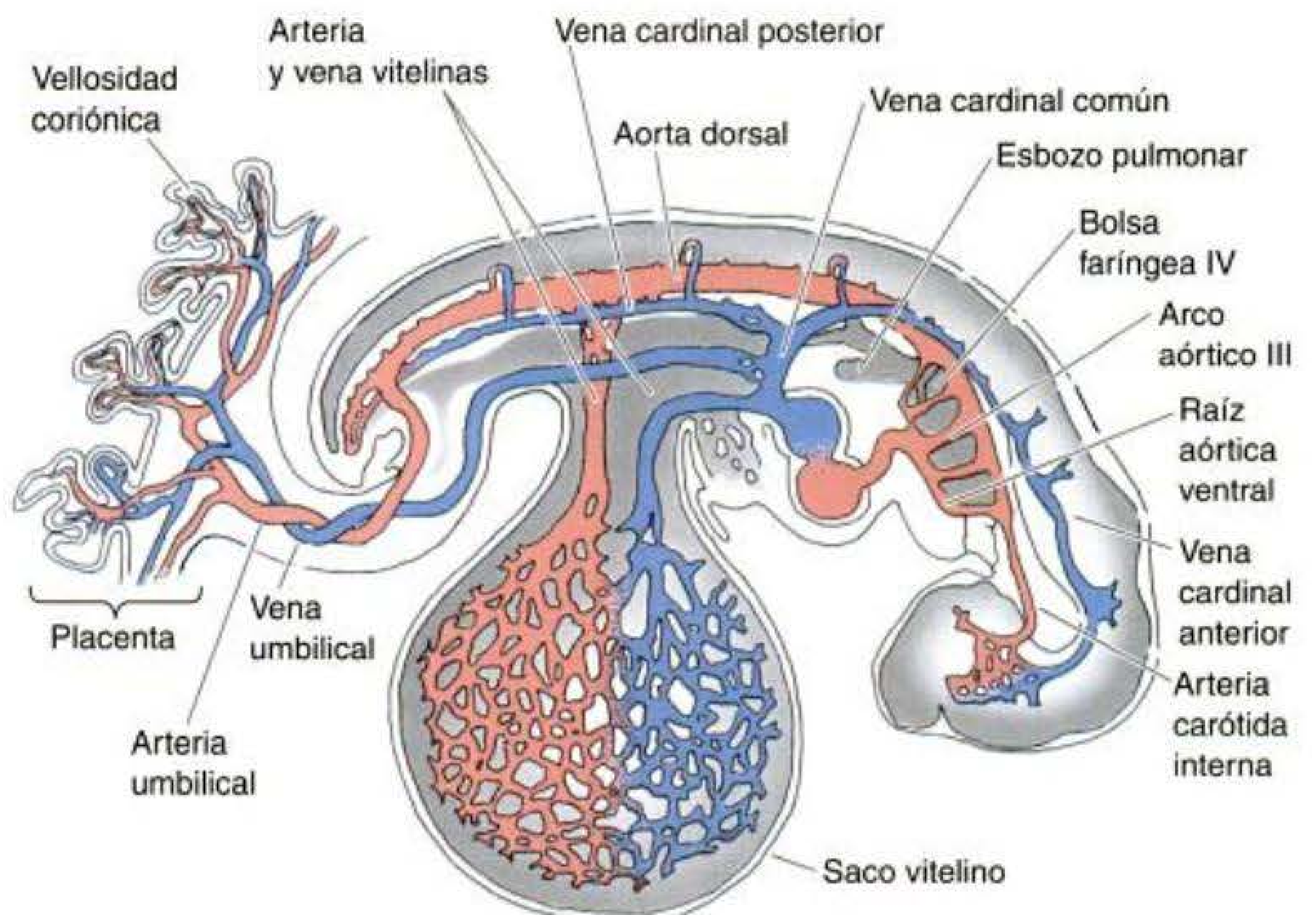


Fig. 15-9. Sistema circulatorio de un embrión humano de 4 semanas. Aunque en este estadio los principales vasos sanguíneos son pares, localizándose a la izquierda y a la derecha, solo se muestran los vasos derechos. Las arterias se muestran en rojo, las venas en azul. (Según Carlson 1981.)

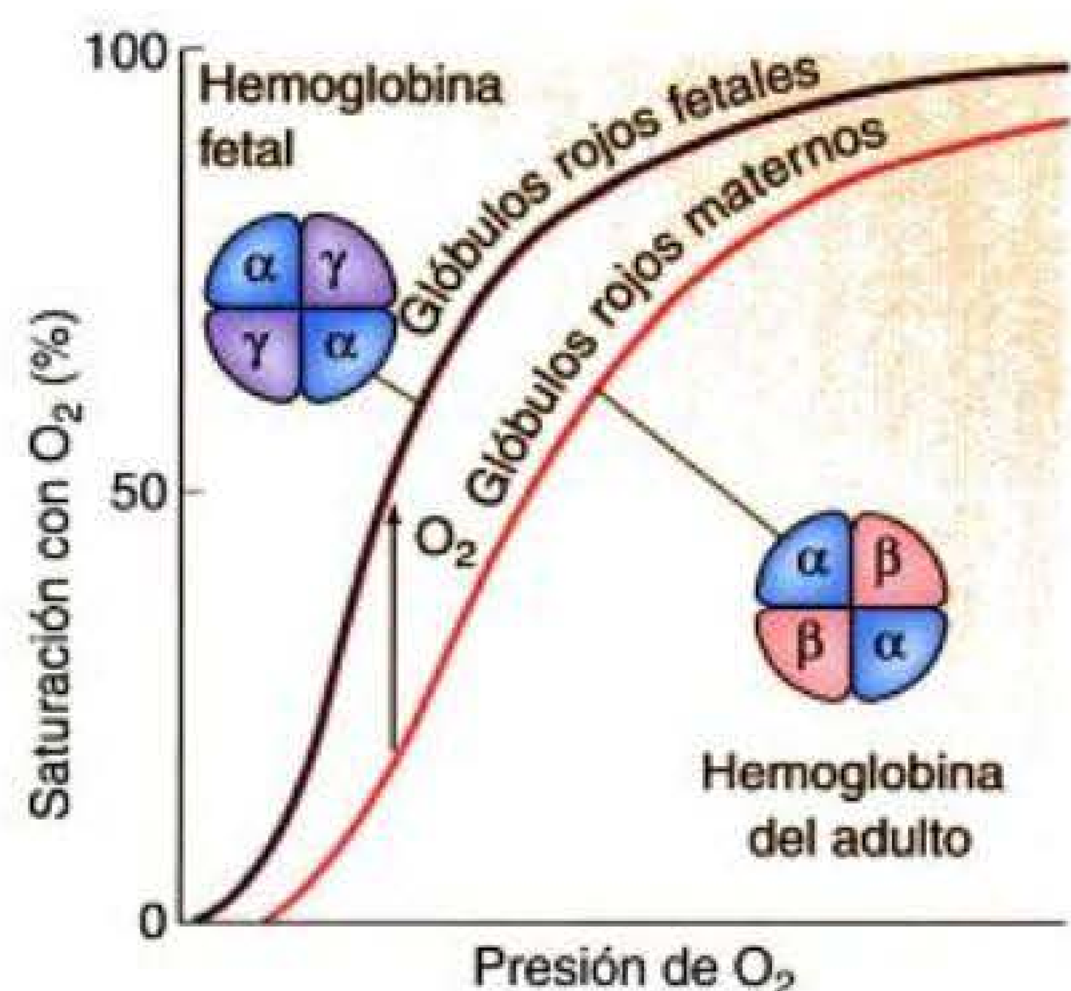
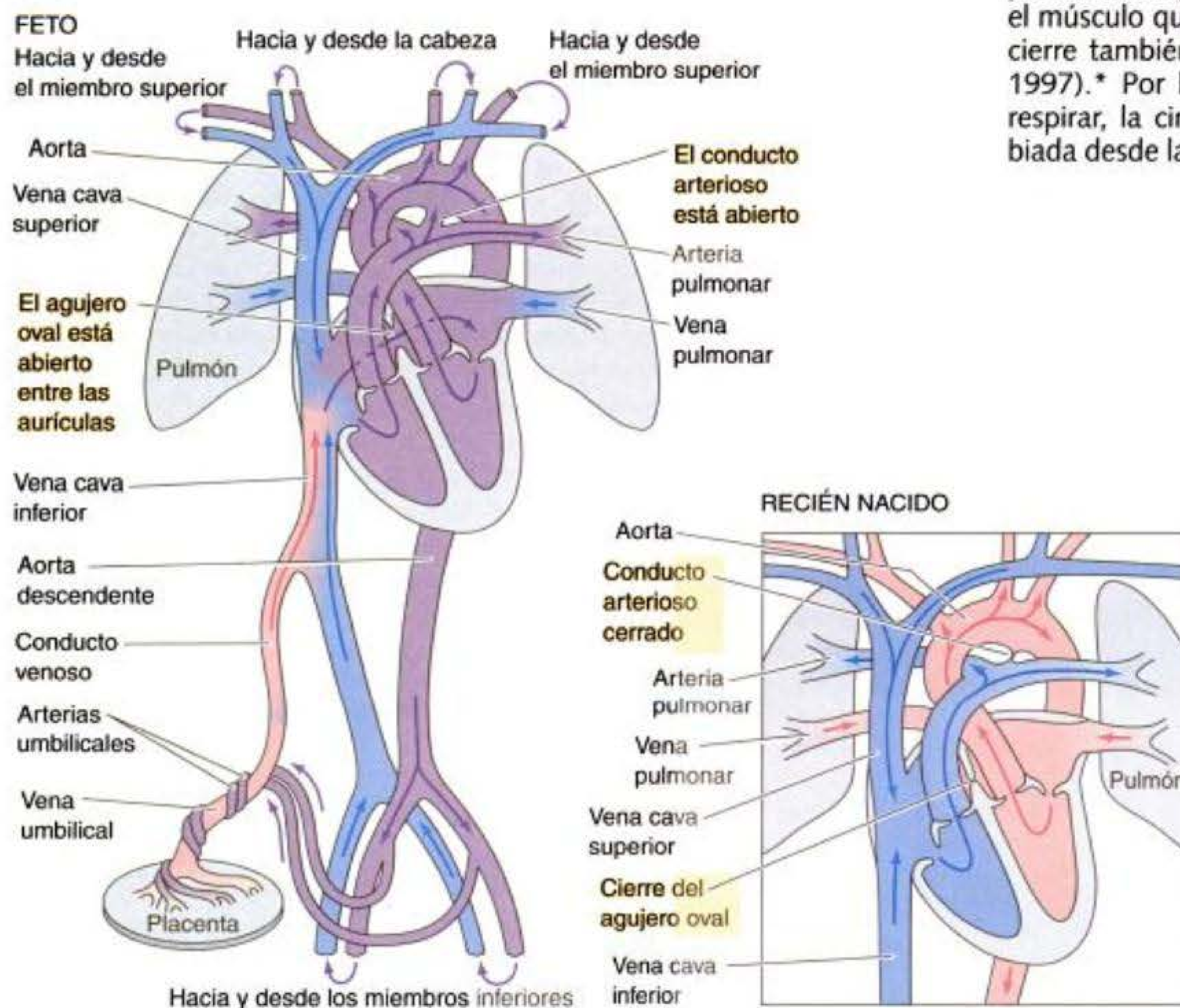


Fig. 15-10. Las moléculas de hemoglobina fetal y del adulto difieren en sus subunidades de globina. La cadena γ fetal une difosfoglicerato con menos avidez que la cadena β del adulto. Como consecuencia, la hemoglobina fetal puede unir oxígeno más eficientemente que lo que lo puede hacer la hemoglobina del adulto. En la placenta, hay un flujo neto (flecha) de oxígeno desde la sangre materna (que cede el oxígeno a los tejidos con baja presión de oxígeno) hacia la sangre fetal (que a la misma presión todavía está tomando oxígeno).

perimentada por el recién nacido hace que el músculo que rodea al conducto arterioso cierre también su abertura (Nguyen y col. 1997).* Por lo tanto, cuando comienza a respirar, la circulación respiratoria es cambiada desde la placenta hacia los pulmones.



* En algunos niños, el tabique falla en cerrarse y el agujero oval continúa abierto. Frecuentemente la abertura es demasiado pequeña de modo tal que los niños no tienen síntomas físicos y el agujero finalmente se cierra. Sin embargo, si no se cierra completamente y falla en formarse el tabique secundario (septum secundum), la abertura del tabique auricular puede provocar dilatación del lado derecho del corazón, que puede llevar a falla cardíaca en la adultez temprana.

Fig. 15-11. Redireccionamiento del flujo sanguíneo humano al nacer. La expansión del aire en los pulmones causa cambios de presión que redireccionan el flujo de la sangre en el niño recién nacido. El conducto arterioso se cierra, interrumpiendo la conexión entre la arteria aorta y la pulmonar, y el agujero oval, un pasillo entre la aurícula izquierda y la derecha, también se cierra. De este modo, el sistema circulatorio se separa de la circulación sistémica.

dose al corazón poco tiempo después. Cada uno de los sistemas circulatorios de cada individuo es diferente, debido a que el genoma no puede codificar las complicadas series de conexiones entre las arterias y las venas. En efecto, el azar juega un papel fundamental en el establecimiento de la microanatomía del sistema circulatorio. Sin embargo, todos los sistemas circulatorios en una especie dada parecen muy semejantes, debido a que el desarrollo del sistema circulatorio está severamente restringido por parámetros fisiológicos, físicos y evolutivos.

Restricciones en la construcción de los vasos sanguíneos

La primera restricción al desarrollo vascular es *fisiológica*. A diferencia de las máquinas nuevas, que no necesitan funcionar hasta que han dejado la línea de montaje, los nuevos organismos tienen que funcionar incluso a medida que se desarrollan. Las células embrionarias deben obtener nutrientes antes de que haya un intestino, utilizar oxígeno antes de que estén los pulmones y excretar

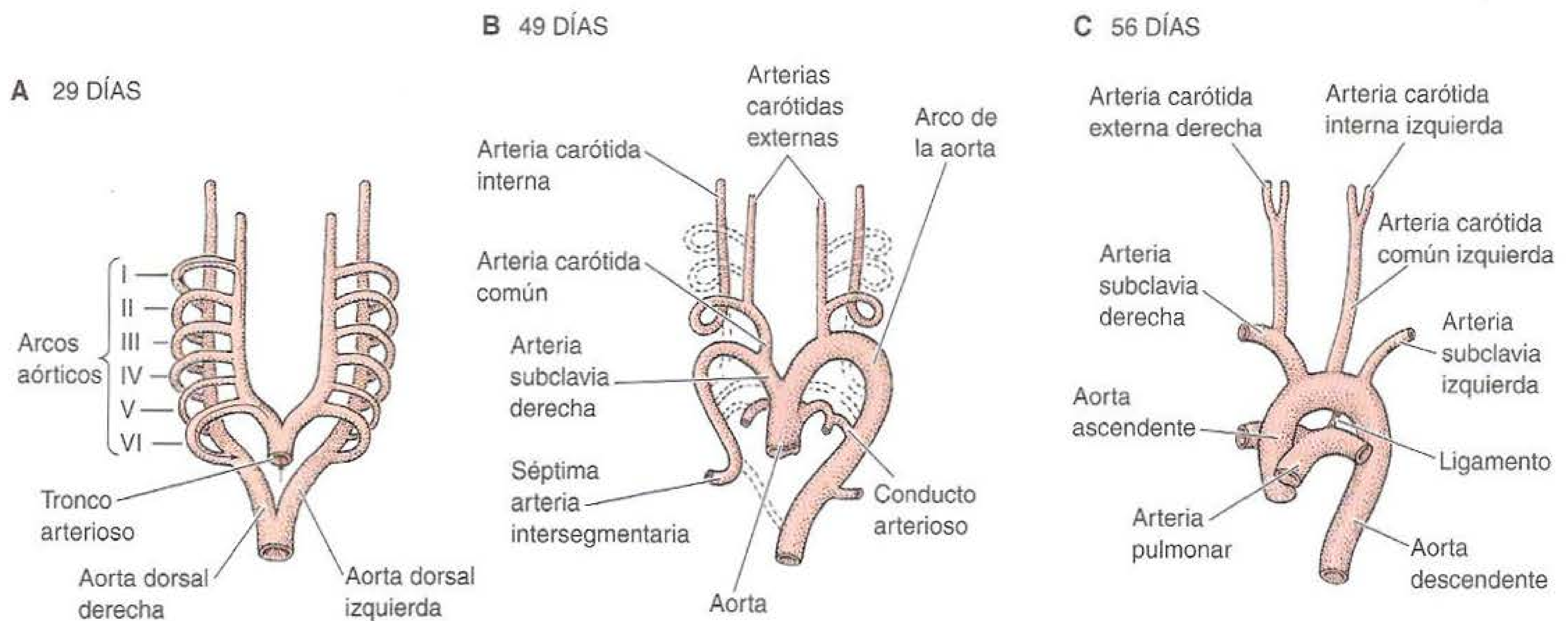


Fig. 15-12. Arcos aórticos del embrión humano. **A.** Originalmente, el tronco arterioso bombea sangre hacia la aorta, que se ramifica a cada lado del intestino anterior. Los seis pares de arcos aórticos toman sangre desde el tronco arterioso y le permiten a ésta fluir hacia la aorta dorsal. **B.** A medida que continúa el desarrollo, los arcos comienzan a desintegrarse o se modifican (las líneas entrecortadas indican estructuras en degeneración). **C.** Finalmente, los arcos remanentes son modificados y se forma el sistema arterial del adulto. (Según Langman 1981.)

desechos antes de tener riñones. Todas estas funciones son mediadas a través del sistema circulatorio embrionario. Por esta razón, la fisiología circulatoria del embrión en desarrollo debe diferir de la del organismo adulto. El alimento no es absorbido a través del intestino, sino del saco vitelino o de la placenta, y la respiración no es llevada a cabo a través de las branquias (agallas) o pulmones, sino mediante las membranas coriónica o alantoidea. Los principales vasos sanguíneos embrionarios deben ser construidos para servir a estas estructuras embrionarias.

La segunda restricción es *evolutiva*. El embrión de mamífero extiende vasos sanguíneos hacia el saco vitelino incluso aunque no haya vitelo dentro (véase fig. 15-9). Además, la sangre deja el corazón a través del tronco arterioso, pasa a través de vasos que circulan sobre el intestino anterior para alcanzar la aorta dorsal. Seis pares de arcos aórticos circulan sobre la faringe (fig. 15-12). En el pez primitivo, estos arcos persisten y permiten que las branquias oxigenen la sangre. En las aves adultas y en los mamíferos, en los que los pulmones oxigenan la sangre, tal sistema tiene poco sentido, pero en los embriones de mamíferos y aves se forman los seis pares de arcos aórticos antes de que el sistema finalmente llegue a ser simplificado en un único arco aórtico. Por lo tanto, aún cuando nuestra fisiología no requiere tal estructura, nuestra condición embrionaria refleja nuestra historia evolutiva.

El tercer grupo de restricciones son *físicas*. De acuerdo con las leyes de movimiento de fluidos, el transporte más efectivo de fluidos es llevado a cabo por grandes tubos. A medida que el radio de un vaso sanguíneo se vuelve más pequeño, la resistencia al flujo se incrementa tanto como *r-4* (ley de Poiseuille). Un vaso sanguíneo que es la mitad de ancho de otro tiene una resistencia al flujo que es 16 veces mayor. Sin embargo, la difusión de nutrientes puede tener lugar solo cuando los flujos sanguíneos se enlentecen y tienen acceso a las membranas celulares. Entonces aquí hay una paradoja: las restricciones a la difusión obligan a que los vasos sean pequeños, mientras que las leyes de la hidráulica obligan a que los vasos sean grandes. Los organismos vivientes han resuelto esta paradoja al evolucionar el sistema circulatorio con una jerarquía de calibres de vasos (LaBarbera 1990). Esta jerarquía se forma muy temprano en el desarrollo (y está bien establecida en el embrión de pollo de 3 días). En perros, la sangre en los grandes vasos (aorta y vena cava) fluye cerca de 100 veces más rápido que lo que lo hace en los capilares. Con un sistema de grandes vasos especializados para el transporte y de pequeños vasos especializados para la difusión (donde la sangre pasa la mayor parte del tiempo), los nutrientes y el oxígeno pueden alcanzar a células individuales del organismo en crecimiento.

Pero ésta no es la historia completa. Si un fluido bajo una presión constante se mueve directamente desde un tubo de gran diámetro hacia un tubo de pequeño diámetro (como en el pico de una manguera), la velocidad del fluido se incrementa. La solución evolutiva a este problema fue el surgimiento de muchos vasos pequeños ramificándose desde uno grande, haciendo el área de sección transversal colectiva de todos los vasos más pequeños mayor que la de los grandes vasos. Los sistemas circulatorios muestran una relación (conocida como ley de Murray) en la que el cubo del radio del vaso progenitor es aproximadamente la suma de los cubos de los radios de los vasos más pequeños. Los modelos computarizados de la formación de vasos sanguíneos deben tener en cuenta no solo los patrones de expresión de genes sino también la dinámica de los fluidos del flujo sanguíneo, si ellos deben mostrar la ramificación y anastomosis de las arterias y las venas (Gödde y Kurz 2001). La construcción de cualquier sistema circulatorio negocia entre todas las restricciones físicas, fisiológicas y evolutivas.

Vasculogénesis: la formación inicial de los vasos sanguíneos

LOS SITIOS DE VASCULOGÉNESIS. La formación de vasos sanguíneos está íntimamente conectada a la forma-

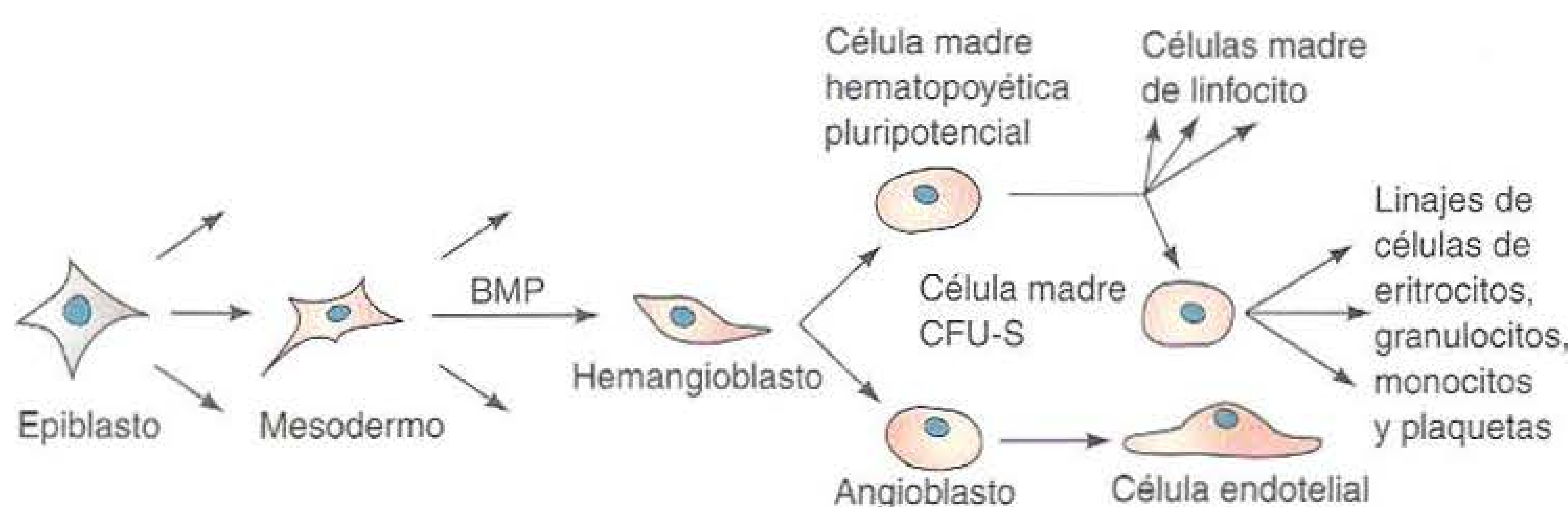


Fig. 15-13. Origen y destino de las células hemangioblásticas. Los hemangioblastos son derivados de las células mesodérmicas que son expuestas a concentraciones relativamente elevadas de ciertas proteínas morfogenéticas del hueso durante el desarrollo temprano. Ellas dan origen a angioblastos -los precursores de las células endoteliales vasculares- y a las células madre hematopoyéticas pluripotenciales que generan a los eritrocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos. (Según Liao y Zon 1999.)

ción de células sanguíneas. En efecto, se cree que los vasos sanguíneos y las células sanguíneas comparten un precursor común, el **hemangioblasto*** (fig. 15-13). Los vasos sanguíneos y las células sanguíneas no solo comparten sitios comunes de origen, sino que las mutaciones de ciertos factores de transcripción en ratones y pez cebra suprimirán a las células sanguíneas y a los vasos sanguíneos. Además, las células sanguíneas más tempranas y los vasos sanguíneos más tempranos comparten muchas de las mismas proteínas poco comunes sobre sus superficies celulares (Wood y col. 1997; Choi y col. 1998; Liao y Zon 1999).

Los vasos sanguíneos son construidos mediante dos procesos, vasculogénesis y angiogénesis (fig. 15-14). Durante la **vasculogénesis**, los vasos sanguíneos son creados de novo desde la lámina del mesodermo lateral. En la primera fase de la vasculogénesis, grupos de células del mesodermo esplácnico son especificadas para llegar a ser hemangioblastos, los precursores de las células sanguíneas y de los vasos sanguíneos† (Shalaby y col. 1997). Estas células se condensan en agregaciones que son denominadas frecuentemente como **islotes sanguíneos**. Las células internas de estos islotes sanguíneos se convierten en las **células madre hematopoyéticas** (**HSC**; del inglés, *hematopoietic stem cells*, las células madre que generan todos los tipos celulares sanguíneos), mientras que las células externas llegan a ser **angioblastos**, las células progenitoras de los vasos sanguíneos. En la segunda fase de la vasculogénesis, los angioblastos se multiplican y diferencian en células **endoteliales**, que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos. En la tercera fase, las células endoteliales forman tubos y se conectan para formar los **plexos capilares primarios**, una red de capilares. El siguiente estadio de la formación de vasos sanguíneos es la **angiogénesis**, esta red primaria será remodelada y recortada hacia lechos capilar, arterial y venoso diferentes (Risau 1997; Hanahan 1997).

En amniotas, la formación de la red vascular primaria se produce en dos regiones distintas e independientes. En primer lugar, se produce la **vasculogénesis extraembrionaria** en los islotes sanguíneos del saco vitelino. En segundo lugar, se produce la **vasculogénesis intraembrionaria** dentro del embrión mismo. La agregación de los hemangioblastos en el saco vitelino es una etapa crítica en el desarrollo de amniotas, para que los islotes sanguíneos que revisten el saco vitelino produzcan las venas que lleven los nutrientes al embrión y transporten gases hacia y desde los sitios de intercambio respiratorio (fig. 15-15). En aves, estos vasos son denominados las **venas vitelinas**; en mamíferos, ellas son las **venas onfalomesentéricas**. En el pollo, los islotes sanguíneos se ven primero en el área opaca, cuando la línea primitiva está en su extensión completa (Pardanaud y col. 1987). Ellos forman cordones de hemangioblastos, que rápidamente se ahuecan. Las células externas de los islotes sanguíneos llegan a ser las células endoteliales planas que revisten los vasos. Las células centrales se diferencian en células sanguíneas embrionarias. A medida que crecen los islotes sanguíneos, finalmente se fusionan para formar la red capilar que se vacía hacia las venas vitelinas, que traen los nutrientes y células sanguíneas hacia el corazón recién formado.

Las redes vasculares intraembrionarias se originan, en general, de una única célula progenitora angioblástica en el mesodermo que rodea a un órgano en desarrollo. Estas células no parecen estar asociadas con la formación de células sanguíneas, como se observa en los islotes sanguíneos extraembrionarios (Noden 1989; Risau 1995; Pardanaud y col. 1989). Es importante comprender que estas redes de capilares intraembrionarias se originan dentro o alrededor del órgano mismo y no son extensiones de vasos más grandes. En efecto, en algunos casos, el órgano en desarrollo produce factores paracrinos que inducen la formación de vasos sanguíneos solamente en su propio mesénquima (Auerbach y col. 1985; LeCouter y col. 2001).

En peces y anfibios, no hay saco vitelino; por lo tanto, no hay ninguna vasculogénesis extraembrionaria. En *Xenopus*, los angioblastos se originan del mesodermo y se unen para formar un plexo vascular. Aquí, nuevamente se observa una interacción entre la lámina lateral del mesodermo y el endodermo. El endodermo no es requerido para la formación de los angioblastos. Sin embargo, sin

---

* El prefijo *hemo-* (o *hemato*) se refiere a sangre (como en la hemoglobina). De manera semejante, el prefijo *angio-* se refiere a vasos sanguíneos. El sufijo *–blasto* denota una célula que se divide rápidamente, frecuentemente una célula madre. El sufijo *–poyesis* se refiere a generación o formación, y es también la raíz de la palabra *poesía*. La forma adjetiva de *–poyesis* es *–poyética*. Entonces, las células madre *hematopoyéticas* son aquellas células que generan los diferentes tipos de células sanguíneas. El sufijo latino *–génesis* (como en angiogénesis) significa lo mismo que el griego *–poyesis*.

† Nuevamente, el endodermo juega un papel esencial en la especificación de la lámina del mesodermo lateral. Aquí, el endodermo visceral interactúa con el mesodermo del saco vitelino para inducir los islotes sanguíneos. El endodermo está probablemente secretando Indian hedgehog, un factor paracrino que activa la expresión de BMP4 en el mesodermo. La expresión de BMP4 retroalimenta sobre el mesodermo mismo, haciendo que éste forme hemangioblastos (Baron 2001).

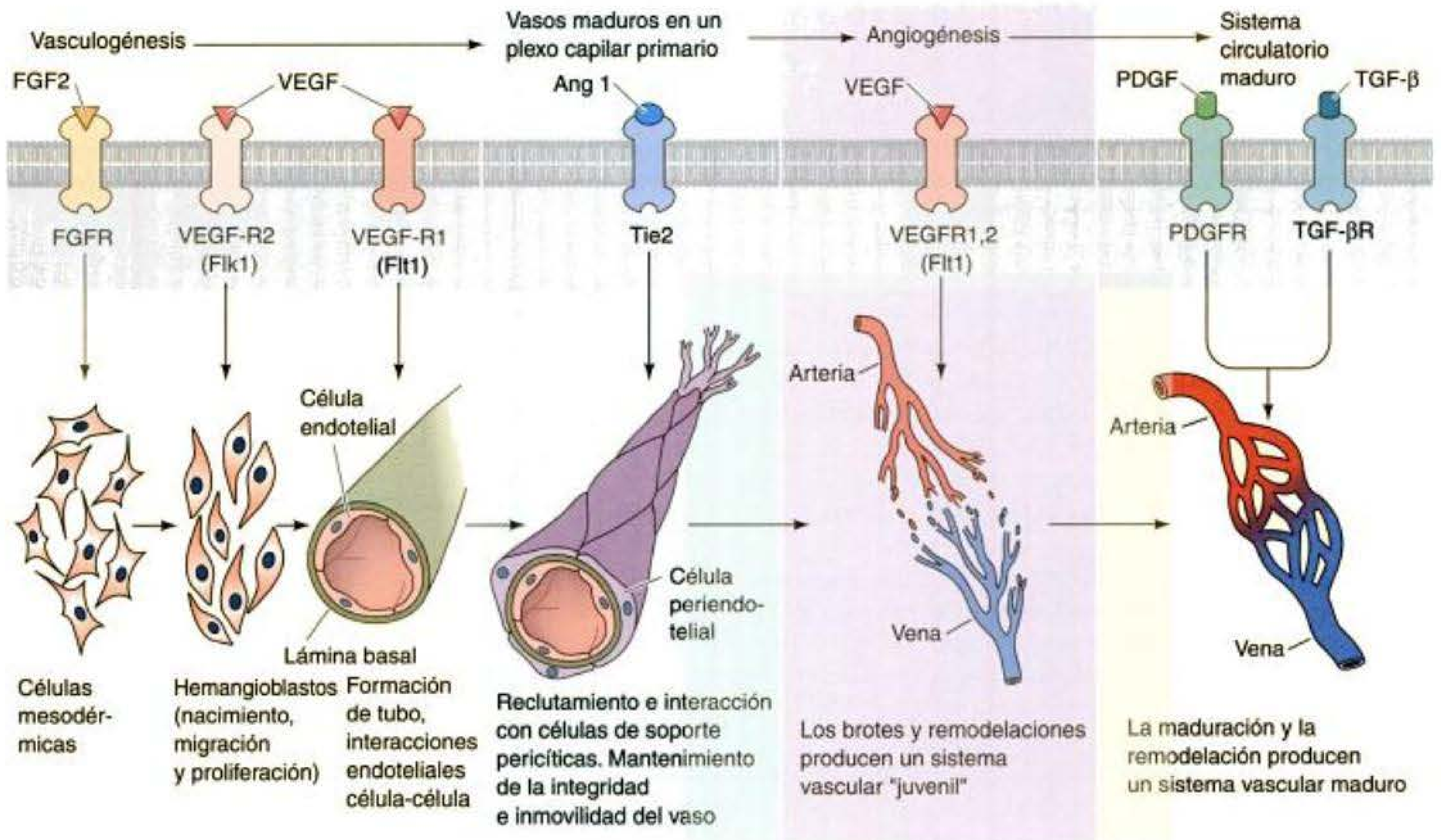


Fig. 15-14. Vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis involucra la formación de los islotes sanguíneos y la construcción de redes capilares desde ellos. La angiogénesis involucra la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la remodelación y la construcción sobre los ya formados. La angiogénesis finaliza las conexiones circulatorias comenzadas por la vasculogénesis. Los principales factores parácrinos involucrados en cada etapa se muestran en la parte superior del esquema y sus receptores (sobre las células formadoras de vaso) se muestran debajo de éstos. (Según Hanahan 1997; Risau 1997.)

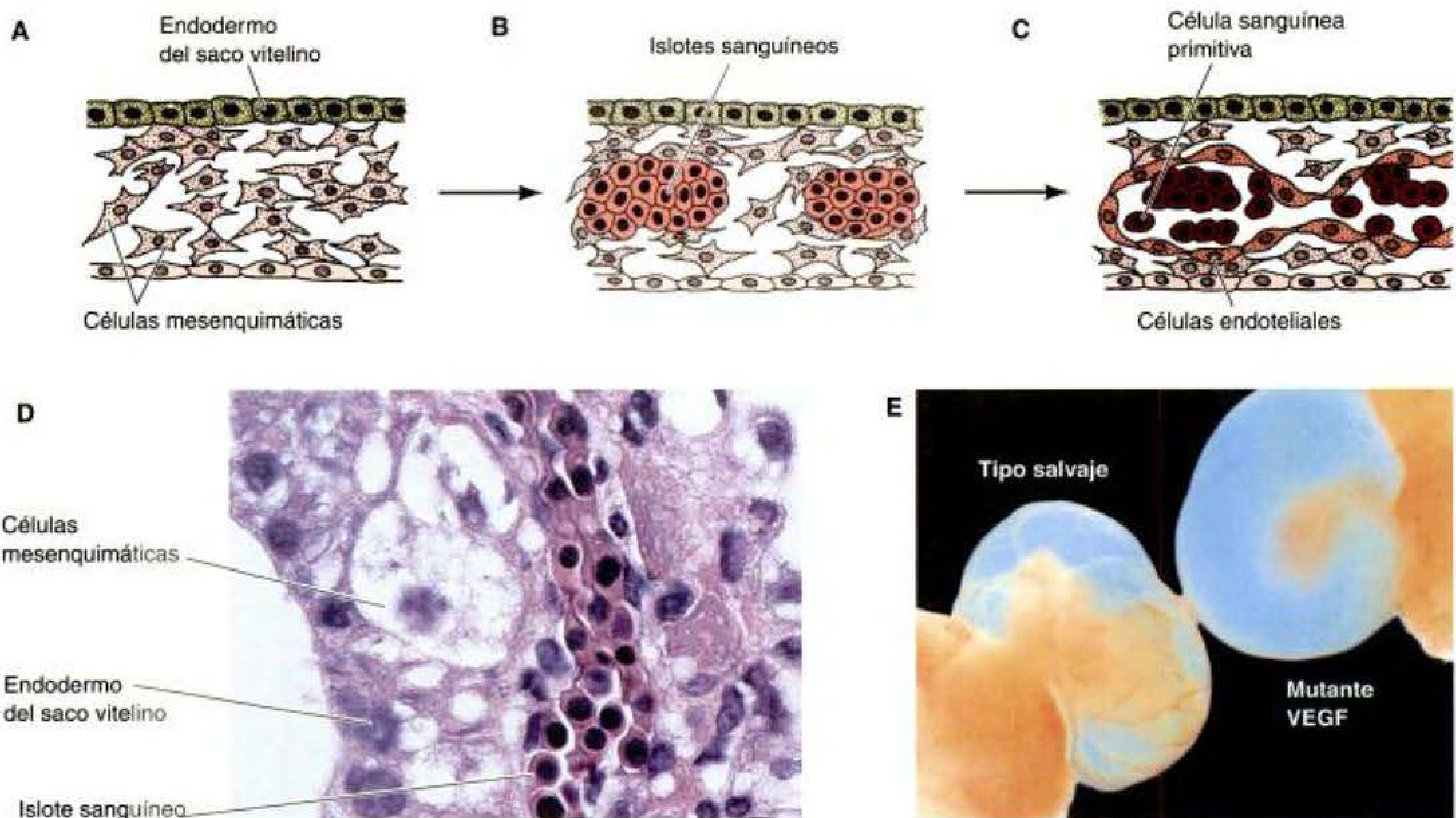


Fig. 15-15. Vasculogénesis. La formación de vasos sanguíneos se observa primero en la pared del saco vitelino, en donde **A**, las células mesenquimáticas indiferenciadas se agrupan para formar **B**, islotes sanguíneos. **C.** El centro de estos grupos forma células sanguíneas y el exterior se desarrolla hacia las células endoteliales de los vasos sanguíneos. **D.** Microfotografía de un islote sanguíneo humano en el mesodermo que rodea al saco vitelino. (La fotografía es de un embarazo en la trompa de Falopio; un embrión que ha sido extirpado debido a que estaba implantado en un oviducto en lugar del útero.) **E.** Sacos vitelinos de un ratón tipo salvaje y una compañera de camada heterocigota para la mutación de pérdida de función de VEGF. El embrión mutante carece de vasos sanguíneos en su saco vitelino y muere. (**A–C**, según Langman 1981; **D**, de Katayama y Rayano 1999; **E**, de Ferrara y Alitalo 1999. Microfotografías cortesía de los autores.)

el endodermo, los angioblastos no pueden formar tubos endoteliales (Vokes y Krieg 2002).

FACTORES DE CRECIMIENTO Y VASCULOGÉNESIS. Tres factores de crecimiento pueden ser responsables del inicio de la vasculogénesis (véase fig. 15-14). Uno de éstos, **el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2)**, es requerido para la generación de hemangioblastos desde el mesodermo esplácnico. Cuando células de los blastodiscos de la codorniz son disociadas en cultivos, no forman islotes sanguíneos o células endoteliales. Sin embargo, cuando estas células son cultivadas en FGF2, surgen los islotes sanguíneos y se forman células endoteliales (Flamme y Risau 1992). FGF2 es sintetizado en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo y es responsable de la vascularización de este tejido (Ribatti y col. 1995).

La segunda proteína involucrada en la vasculogénesis es el **factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF**; del inglés, *vascular endothelial growth factor*). VEGF parece permitir la diferenciación de los angioblastos y su multiplicación para formar tubos endoteliales. VEGF es secretado por las células mesenquimáticas cerca de los islotes sanguíneos, y los hemangioblastos y angioblastos tienen receptores para VEGF* (Millauer y col. 1993). Si los embriones de ratón carecen de los genes que codifican VEGF o el receptor principal para VEGF (el receptor tirosinacinasa Flk1), los islotes sanguíneos del saco vitelino no se forman y la vasculogénesis no tiene lugar (fig. 15-15E; Ferrara y col. 1996). Los ratones que carecen de los genes para el segundo receptor de VEGF (el receptor tirosinacinasa Flt1) tienen islotes sanguíneos y células endoteliales diferenciadas, pero estas células no están organizadas en vasos sanguíneos (Fong y col. 1995; Shalaby y col. 1995). Como se vio en el capítulo 14, VEGE también es importante en la formación de los vasos sanguíneos hacia el hueso y el riñón en desarrollo.

Un tercer grupo de proteínas, las **angiopoyetinas**, median la interacción entre las células endoteliales y las células tipo **pericitos** –músculo liso– reclutadas para cubrirlas. Las mutaciones de las angiopoyetinas o de su receptor, Tie2, conducen a vasos sanguíneos malformados que son deficientes en el músculo liso que frecuentemente los rodea (Davis y col. 1996; Suri y col. 1996; Vikkula y col. 1996; Moyon 2001).

* VEGF necesita ser regulado muy cuidadosamente en adultos y estudios recientes indican que éste puede ser afectado por la dieta. El consumo de té verde ha sido asociado con incidencias más bajas de cáncer humano y la inhibición de crecimiento celular tumoral en animales de laboratorio. Cao y Cao (1999) han demostrado que el té verde y uno de sus componentes, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), evitan la angiogénesis mediante la inhibición de VEGF. Además, en ratones que toman té verde en lugar de agua (a niveles similares a humanos después de tomar 2 o 3 tazas de té), la capacidad de VEGF para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos fue reducida en más de un 50%. Tomar cantidades moderadas de vino tinto ha sido correlacionado con enfermedad coronaria reducida. Se ha demostrado que el vino tinto reduce la producción de VEGF en adultos y parece hacerlo al inhibir a la endotelina-1, un componente que induce a VEGF y que es crucial para la formación de placas ateroscleróticas (Corder y col. 2001; Spinella y col. 2002).

Angiogénesis: brotación de los vasos sanguíneos y remodelación de los lechos vasculares

Después de la fase inicial de vasculogénesis comienza la angiogénesis. Mediante este proceso, son remodeladas las redes de capilares primarios y se producen las venas y las arterias (véase fig. 15-14). La matriz extracelular es extremadamente importante en la regulación de la angiogénesis. En primer lugar, VEGF actúa solo sobre los capilares recién formados; esto hace que se pierdan los contactos célula-célula y produce una degradación de la matriz extracelular en ciertos puntos. Las células endoteliales expuestas proliferan y brotan desde estas regiones, formando finalmente un nuevo vaso. También se pueden formar nuevos vasos en el lecho capilar primario por separación de un vaso existente en dos. La pérdida de los contactos célula-célula también puede permitir la fusión de capilares para formar vasos más amplios –las arterias y las venas. Finalmente se forma la red capilar madura y es estabilizada por TGF-β (que aumenta la matriz extracelular) y por el **factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF**; del inglés, *platelet-derived growth factor*), que es necesario para el reclutamiento de las células pericíticas que contribuyen a la flexibilidad mecánica de la pared capilar (Lindahl y col. 1997).

Se ha demostrado recientemente que los vasos sanguíneos contienen poderosos inhibidores de metaloproteasas (que digieren las matrices extracelulares), y que la angiogénesis solo se puede producir cuando estos inhibidores son regulados en menos (Oh y col. 2001). Un regulador extremadamente importante de la angiogénesis puede ser una forma particular de colágeno, **colágeno XVIII**, el mismo colágeno que está involucrado en la formación de ramas epiteliales (véase cap. 14). Este colágeno no solo estabiliza estructuralmente a los capilares, sino que también parece defender químicamente a los vasos sanguíneos contra las metaloproteasas (Ergun y col. 2001). Cuando el colágeno XVIII es segmentado por las metaloproteasas, su aminoácido C-terminal 184 forma una proteína denominada **endostatina**. Endostatina tiene funciones muy diferentes de las del colágeno. Ésta impide la angiogénesis al inhibir la expresión de ciclina e interferir con la unión de VEGF a su receptor (Zatterstrom y col. 2000; Hanai y col. 2002; Kim y col. 2002). Cuando se generan nuevos vasos sanguíneos, la producción de endostatina es regulada en menos (Wu y col. 2001). Además, endostatina puede impedir el crecimiento y diseminación de tumores. Los tumores son "exitosos" solo cuando son capaces de dirigir a los vasos sanguíneos hacia ellos. Por esta razón, tales factores pueden ser importantes aplicaciones médicas como un medio de evitar el crecimiento y metástasis del tumor (Folkman y col. 1971; Fidler y Ellis 1994; véase cap. 21).

SITIO WEB 15.3 **Angiogénesis en diabetes y formación de tumores (Angiogenesis in diabetes and tumor formation).** La angiogénesis es una parte crítica de la formación de tumores y en los efectos de la diabetes. Algunas proteínas recientemente descubiertas, como angiostatina, endostatina y escualamina que pueden inhibir la angiogénesis, pueden proporcionar curas para el cáncer.

Mecanismos de la diferenciación arterial y venosa

Una clave para la comprensión de los mecanismos por los cuales se forman las venas y las arterias fue el descubrimiento que los plexos capilares primarios en ratones en realidad contienen dos tipos de células endoteliales. Las precursoras de las arterias contienen efrina-B2 en sus membranas celulares y las precursoras de las venas contienen uno de los receptores para esta molécula, EphB4 tirosinacinasa, en sus membranas celulares (fig. 15-16; Wang y col. 1998). Si se hace el knockout de la efrina B-2 en ratones, se produce vasculogénesis, pero no angiogénesis. Se piensa que durante la angiogénesis EphB4 interactúa con su ligando, efrina-B2, de dos modos. En primer lugar, en los bordes de los capilares venosos y arteriales, ésta asegura que los capilares arteriales se conecten solamente con los venosos. En segundo lugar, en las áreas que no son bordes, asegura que la fusión de los capilares para hacer grandes vasos se produzca solo entre el mismo tipo de vaso.

En el pez cebra, la separación de las células arteriales y venosas se produce muy temprano en el desarrollo. Los angioblastos se desarrollan en la parte posterior del mesodermo lateral y migran hacia la línea media del embrión, donde se unen para formar la aorta (arteria) y la vena cardinal por debajo de ésta (fig. 15-17). Zhong y colegas (2001) siguieron a angioblastos individuales y encontraron que, contrariamente a las expectativas, toda la progenie de un único angioblasto formaba venas o arterias, nunca ambas. En otras palabras, cada angioblasto ya estaba especificado en cuanto a si formaría aorta o vena cardinal. Esta especificación parece ser controlada por la vía de señalización de Notch* (Lawson y col. 2001; 2002). La represión de la señal de Notch da como resultado la pérdida de expresión de efrina-B2 en las arterias y su reemplazo por venas. Por el contrario, la activación de la señal de Notch suprime el desarrollo venoso, haciendo que se formen más células arteriales. La activación de las proteínas Notch en las membranas de los angioblastos presuntivos causan la activación del factor de transcripción **Gridlock**. Gridlock a su vez activa la expresión de Efrina-B2 y de otros marcadores arteriales, mientras que los angioblastos con bajas cantidades de Gridlock llegaron a ser las células de venas que expresan EphB4.

Entonces, ¿qué controla la expresión de Notch? Los estudios en el pez cebra y en los ratones han revelado que VEGF funciona más tempranamente que lo que se había pensado en un principio, y que esto es crítico en la inducción de la diferenciación de vasos arteriales. La reducción de la actividad de VEGF en el pez cebra evita la activación de Notch y el posterior desarrollo de las arterias, mientras que la inyección de mRNA de *VEGF* en las células de la vena cardinal posterior induce la expresión de efrina-B2 (arterial) en estas células (Lawson y col. 2002). Esto también explica la estrecha asociación de las arterias con los nervios periféricos en la piel embrionaria. Las neuronas sensoriales y su glía expresan VEGF y este VEGF es suficiente para inducir arterias en las células endoteliales vecinas (Martin y Lewis 1989; Mukouyama y col. 2002). Weinstein y Lawson (2003) especularon que los lechos vasculares se formaban en un proceso de dos etapas. En primer lugar, las nuevas arterias se forman en respuesta a VEGF. En segundo lugar, estas arterias luego inducen a los angioblastos vecinos (posiblemente a través de las interacciones efrina/Eph) a formar los vasos venosos que proporcionarán el retorno para la sangre arterial (fig. 15-18A). Este especulación coincide con las observaciones detalladas del desarrollo vascular del pollo hechas (y exquisitamente dibujadas) por Popoff (1894) e Isida (1956). Los investigadores encontraron que las arterias vitelinas aparecen primero dentro de la

* El uso coordinado de las vías de señalización de Notch y Eph es también utilizado para regular la producción de neuroblastos y somitas.

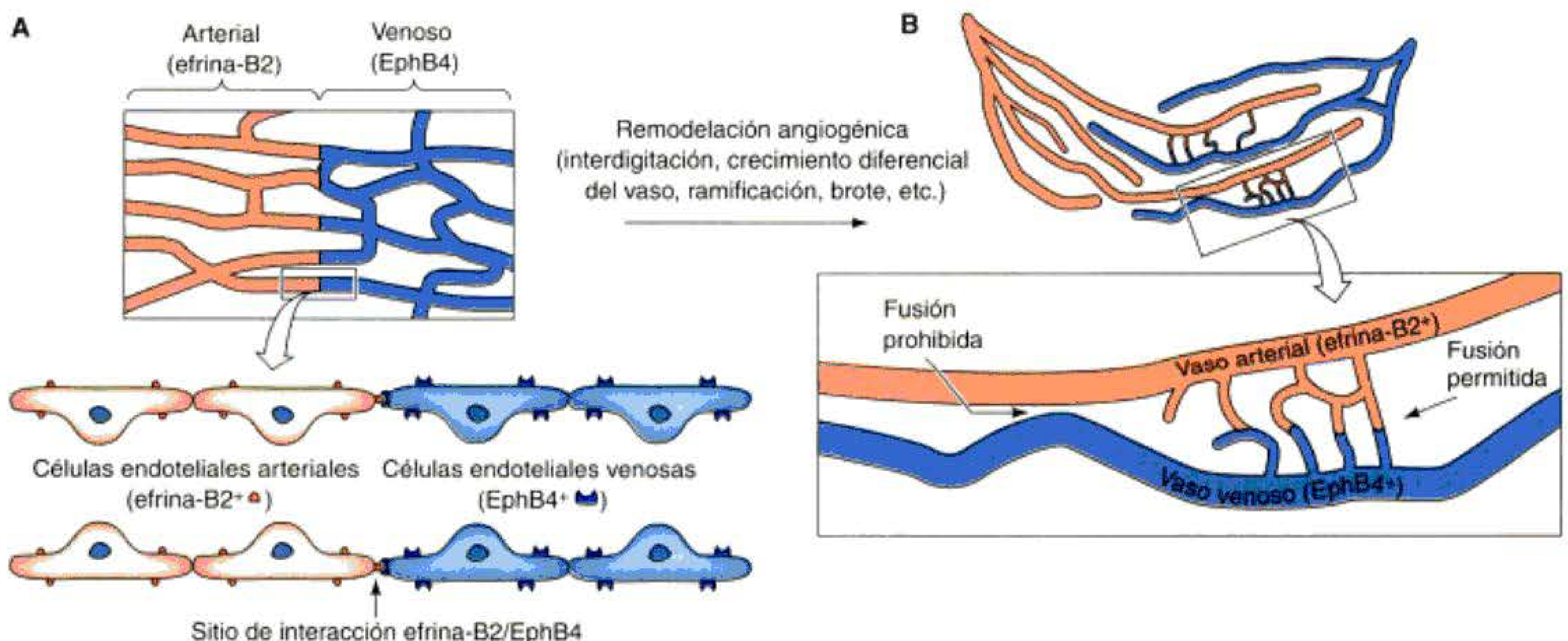


Fig. 15-16. Modelo de los papeles de efrina y los receptores de Eph durante la angiogénesis. **A.** Plexo capilar primario producido por vasculogénesis. Las células endoteliales arteriales y venosas se han segregado entre ellas por la presencia de efrina-B2 o EphB4 en sus respectivas membranas celulares. **B.** Una red vascular en maduración por medio de la cual las interacciones efrina-Eph median la unión de pequeñas ramas (futuros capilares) y puede evitar la fusión lateralmente. (Según Yancopopoulos y col. 1998.)

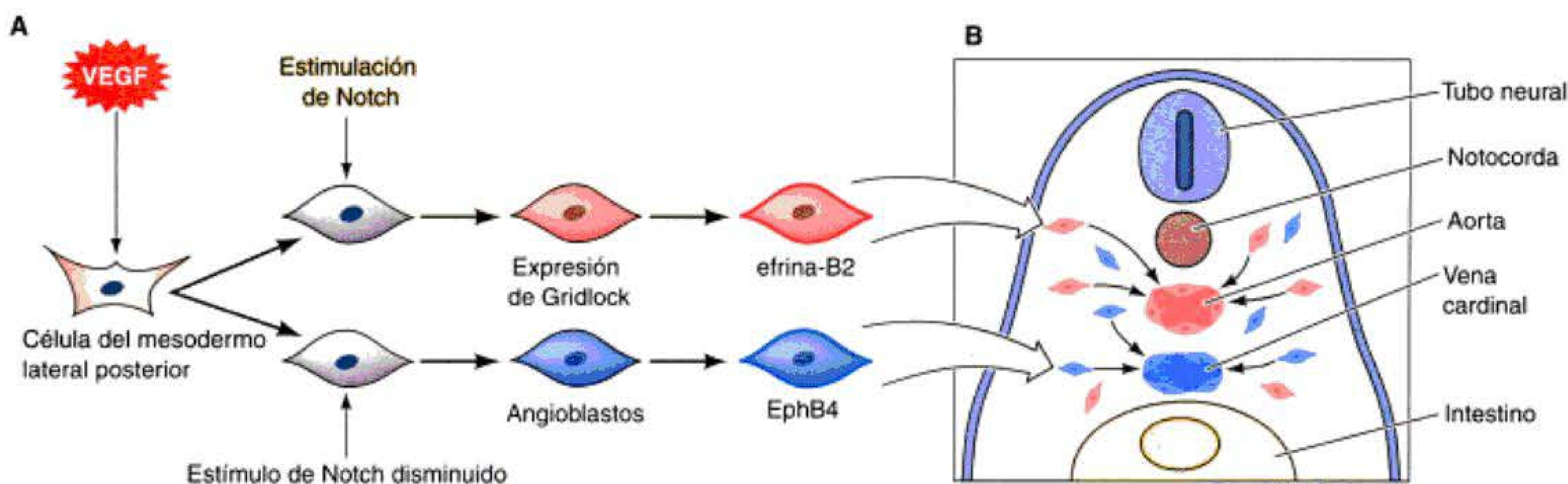


Fig. 15-17. Especificación de los vasos sanguíneos en el embrión del pez cebra. **A.** Los angioblastos que experimentan activación de Notch regulan en más al factor de transcripción Gridlock. Estas células expresan efrina-B2 y llegan a ser células de la aorta. Aquellos angioblastos que experimentan una activación significativamente menor de Notch no expresan Gridlock y se transforman en células que expresan EphB4 de las venas cardinales. **B.** Una vez comprometidas para formar venas o arterias, las células migran hacia la línea media del embrión y contribuyen a la formación de la aorta o de las venas cardinales.

red capilar y que estos capilares parecen inducir venas a cada lado de ellas (fig. 15-18B-D).

Varios órganos producen sus propios factores de angiogénesis. Las células de la placenta son especialmente expertas en la creación de nuevos vasos sanguíneos, debido a que ellas son responsables de traer a los suministros sanguíneos fetal y materno en estrecha aposición. Estas células secretan varios factores de angiogénesis, incluida **leptina**, una hormona involucrada en la supresión del apetito en el adulto. Sin embargo, la leptina también puede actuar localmente para inducir angiogénesis y hacer que las células endoteliales se organicen en tubos (Antczak y col. 1997; Sierra-Honigmann y col. 1998). La vasculatura renal deriva principalmente desde brotes de células endoteliales de la aorta durante las etapas iniciales de nefrogénesis. Las nefronas en desarrollo secretan VEGF, permitiéndole por lo tanto el ingreso de los vasos sanguíneos al riñón en desarrollo y que formen las asas capilares de aparato glomerular (Kitamoto y col. 2002).

SITIO WEB 15.4 **Migración de angioblastos en el pollo (Angioblast migration in the chick).** Después de su formación inicial en el mesodermo del saco vitelino, las células madre de angioblastos se observan en los somitas y en el mesodermo esplácnico. Estas células madre ocupan diferentes regiones del embrión. Los vasos linfáticos se desarrollan desde células endoteliales especializadas en vasos sanguíneos preexistentes.

El desarrollo de las células sanguíneas

Concepto de célula madre

Muchos tejidos del adulto son formados desde células que no pueden ser reemplazadas. La mayoría de las neuronas y los huesos, por ejemplo, no pueden ser reemplazados si se dañan o se pierden. Sin embargo, hay varias poblaciones de células que constantemente mueren y están siendo reemplazadas. Cada día, perdemos y reemplazamos cerca de 1,5 gramos de células de la piel y cerca de 10^{11} células sanguíneas. Las células de la piel son mudadas y los glóbulos rojos sanguíneos son eliminados en el bazo. Sus reemplazos vienen desde poblaciones de células madre.

Como se mencionó en capítulos anteriores, una **célula madre** es una célula que es capaz de abundante proliferación, creando más células madre (autorrenovación) así como más progenie celular diferenciada (Figura 15-19). Las células madre adultas son, en efecto, poblaciones de células embrionarias dentro de un organismo adulto, que producen continuamente más células madre como también células que pueden experimentar posterior desarrollo y diferenciación (Potten y Loeffler 1990). Nuestras células sanguíneas, las células de la cripta intestinal, las células epidérmicas y los espermatocitos (en el macho) son poblaciones en un equilibrio constante en el que la producción celular compensa la pérdida celular (Hay 1966). En la mayoría de los casos, las células madre pueden producir más células madre o más células diferenciadas cuando el equilibrio del cuerpo es estresado por heridas o por factores ambientales. (Esto se observa por la producción de enormes números de glóbulos rojos cuando el cuerpo se ve afectado de anoxia.)

La célula madre crítica en hematopoyesis es la célula madre hematopoyética pluripotencial. Frecuentemente referida solamente como célula madre hematopoyética (HSC; del inglés, *hemtopoietic stem cell*), este tipo celular puede generar todas las células de la serie eritroide, mieloide y linfoide del cuerpo. Como se verá, la HSC pluripotencial genera una serie de células madre intermediarias cuyo potencial es restringido a ciertos linajes.

Sitios de hematopoyesis

El desarrollo sanguíneo de los vertebrados se produce en dos fases: una **fase embrionaria ("primitiva")** transitoria de hematopoyesis y una **fase definitiva ("adulta")** posterior. Estas fases difieren en sus sitios de producción de células sanguíneas, en el ritmo de hematopoyesis, en la morfología de las células producidas y aún en el tipo de genes de la globina activos en los glóbulos rojos san-

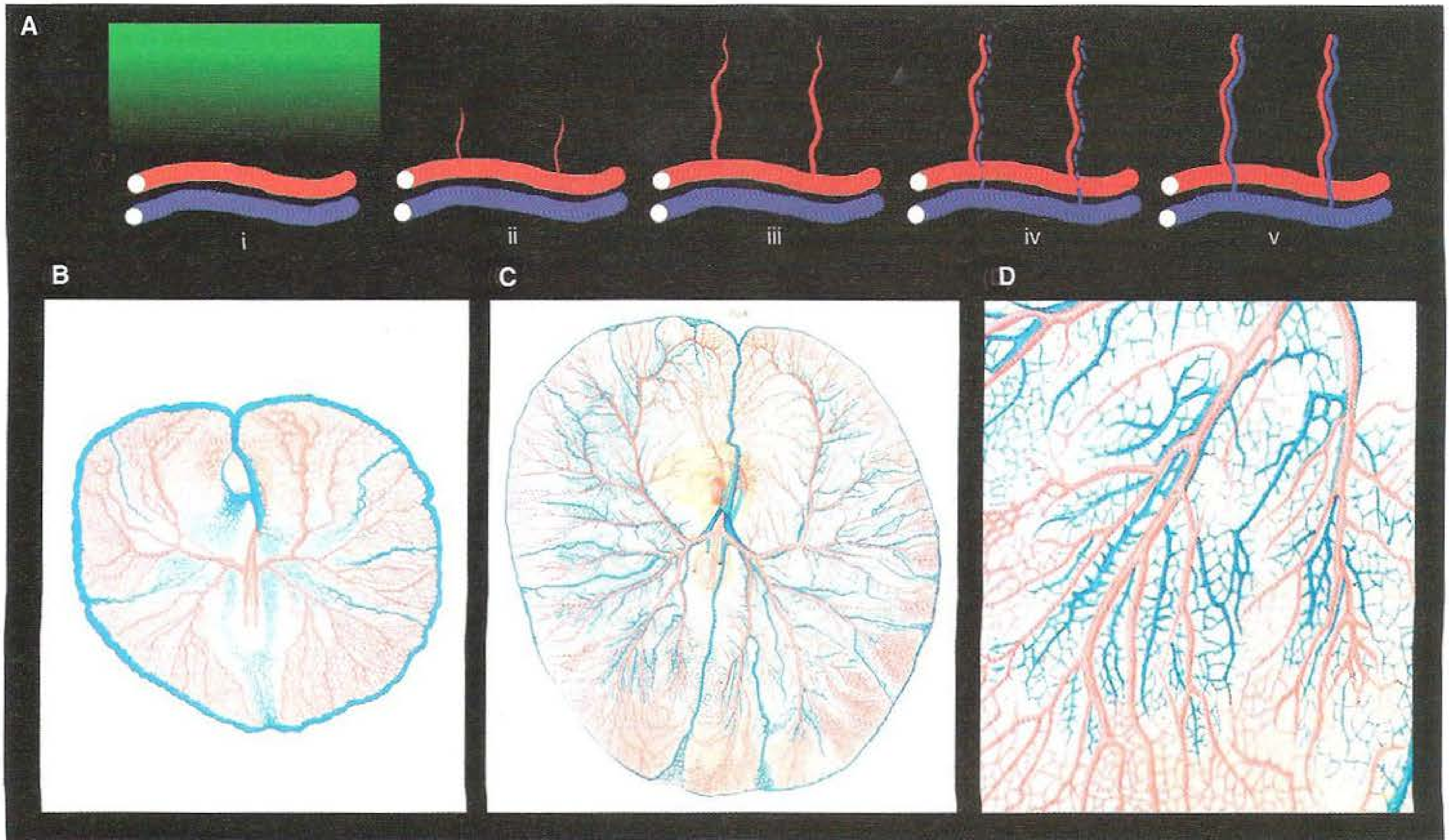


Fig. 15-18. Modelo para la formación de vasos sanguíneos en el blastodermo del pollo. **A.** En respuesta a VEGF (gradiente verde), las células endoteliales son inducidas a ser arterias (rojo), y estas arterias inducen la formación de venas (azul) adyacentes a ellas. Nuevos vasos arteriales brotan a partir de las arterias y luego inducen a los vasos venosos adyacentes a ellos. **B.** En el embrión de pollo, surge una compleja red venosa ramificada en la región vascular, con drenajes venosos en la periferia, a través de la vena marginal. **C.** En estadios tardíos, las venas colaterales surgen adyacentes a las arterias. **D.** Mayores aumentos de la región recuadrada de C. (Según Weinstein y Lawson 2003; **B-D**, modificado de Popoff 1894, cortesía de N. D. Weinstein.)

guíneos. La fase embrionaria de la hematopoyesis es utilizada probablemente para proporcionar al embrión con sus glóbulos rojos iniciales y con su red capilar al vitelo. La fase definitiva de hematopoyesis es utilizada para generar más tipos celulares y para proporcionar células madre que durarán toda la vida del individuo.

La hematopoyesis embrionaria está asociada con los islotes sanguíneos en el mesodermo ventral cerca del saco vitelino. En los embriones de pollo, las primeras células sanguíneas se observan en aquellos islotes sanguíneos que se forman en la zona marginal posterior cerca del sitio de iniciación del hipoblasto (Wilt 1974; Azar y Eyal-Giladi 1979). En *Xenopus*, el mesodermo ventral forma un islote sanguíneo grande que es el primer sitio de hematopoyesis. Los BMP son cruciales en la inducción de células formadoras de tipos celulares sanguíneos en todos los vertebrados estudiados. BMP2 y BMP4 ectópicos pueden inducir la formación de sangre y de vasos sanguíneos en el *Xenopus* y la interferencia con la señal de BMP evita la formación de tipos celulares sanguíneos (Maeno y col. 1994; Hemmati-Brivanlou y Thomsen 1995). En el pez cebra, la mutación *swirl*, que impide la señalización de BMP2, además produce la abolición del mesodermo ventral y la producción de células sanguíneas (Mullins y col. 1996). Como se mencionó antes, BMP4 es crítica en la formación de islotes sanguíneos en el mesodermo extraembrionario de mamíferos.

Sin embargo, se piensa que esta población celular hematopoyética embrionaria es transitoria. Las células madre hematopoyéticas que están durante toda la vida del organismo son derivadas del área mesodérmica que rodea a la aorta. Esto fue demostrado por una serie de elegantes experimentos llevados a cabo por Dieterlen-Lièvre, quien injertó el blastodermo de pollos sobre el saco vitelino de la codorniz Japonesa (fig. 15-20). Las células de pollo son rápidamente distinguibles de las células de la codorniz debido a que el núcleo de la célula de la co-

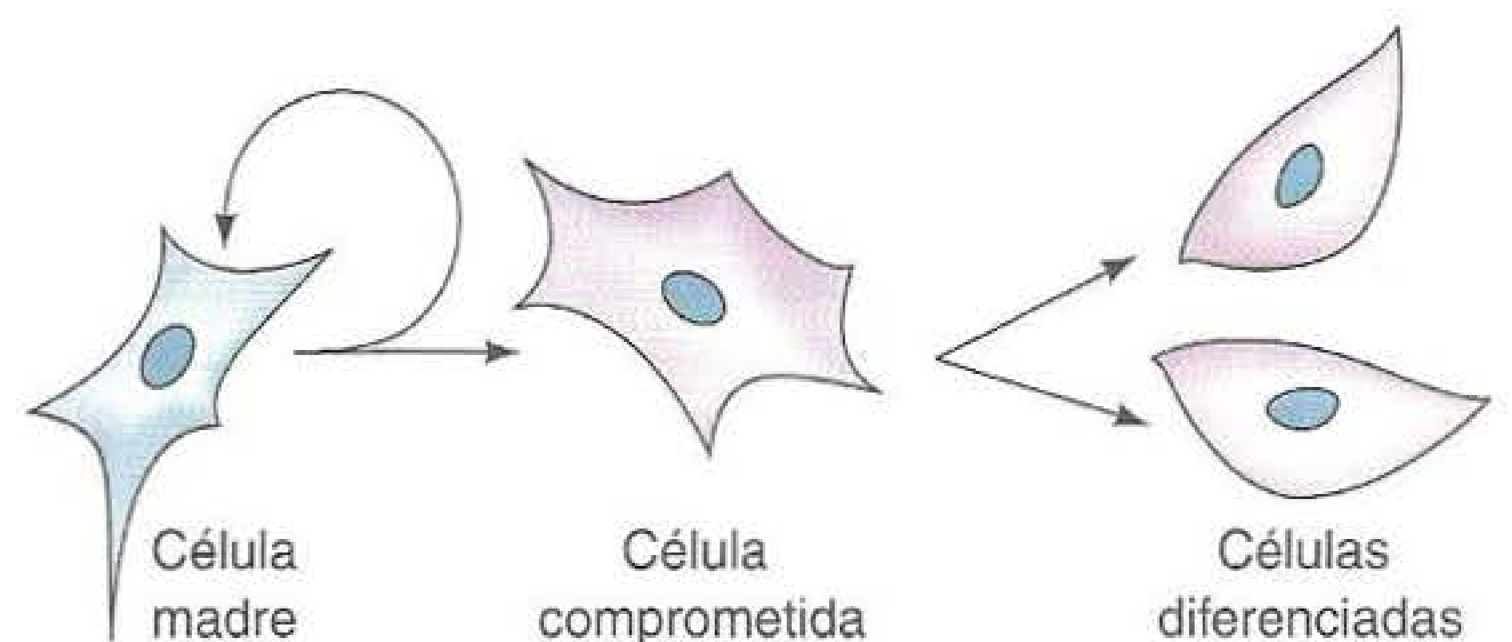


Fig. 15-19. El concepto de las células madre. Una célula madre se divide para producir otra célula madre y una célula comprometida. La célula comprometida puede dividirse nuevamente, pero su progenie tiene la capacidad para formar solo un grupo restringido de tipos celulares diferenciados. Una célula madre también puede producir dos células madre o dos células comprometidas. Si un número significativo de células madre se divide para producir dos células comprometidas, será limitada la longevidad del linaje de la célula madre.

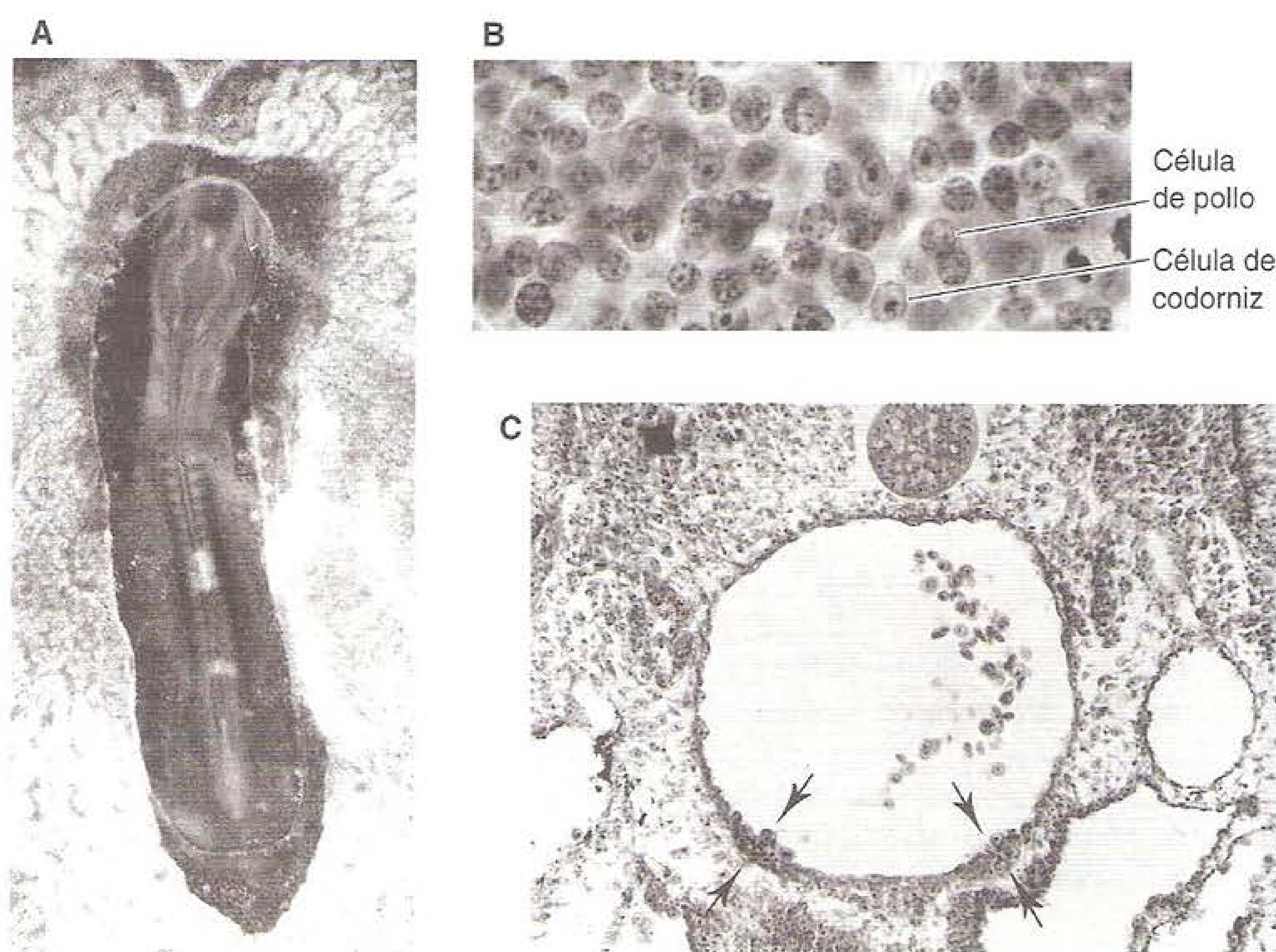


Fig. 15-20. Mapeo de célula sanguínea que utiliza quimeras pollo-codorniz. A. Microfotografía de una "quimera de saco vitelino", creada mediante el trasplante de blastodermo de una codorniz hacia el saco vitelino de un pollo. B. Microfotografía de células de pollo y de codorniz en el timo de un animal quimérico, que muestra la diferencia en la tinción nuclear. Las células linfoides son todas de pollo, mientras que las células estructurales del timo son de origen de la codorniz. C. Sección a través de la aorta de un embrión de pollo de 3 días, en la que se muestra a las células (flechas) que dan origen a las células madre hematopoyéticas. Si las células de esta región son tomadas desde embriones de codorniz y colocadas en embriones de pollo, los embriones de pollo tendrán sangre de codorniz. (De Martin y col. 1978, y Dieterlen-Lièvre y Martin 1981; microfotografías cortesía de F. Dieterlen-Lièvre.)

dorniz se tiñe mucho más oscuro (debido a su denso nucléolo), esto proporciona un marcador permanente para distinguir los dos tipos de célula (véase fig. 1-10). Con el uso de estas "quimeras de saco vitelino," Dieterlen-Lièvre y Martin (1981) demostraron que las células madre del saco vitelino no contribuyen con células al animal adulto. En su lugar, las células madre definitivas son formadas dentro de nódulos de mesodermo que cubren al mesenterio y a los vasos sanguíneos principales. En el embrión de pollo de 4 días, la pared de la aorta parece ser la fuente más importante de nuevas células sanguíneas y se ha encontrado que ésta contiene numerosas células madre hematopoyéticas (Cormier y Dieterlen-Lièvre 1988).

De modo semejante, los estudios en peces, mamíferos y ranas indican que las células madre hematopoyéticas definitivas se forman cerca de la aorta en un dominio denominado la región **aorta-gonáda-mesonefros (AGM)**. Las primeras células sanguíneas en el embrión de ratón aparecen en el mesodermo alrededor del saco vitelino, pero hacia el día 11, las células madre hematopoyéticas pluripotenciales pueden ser halladas en la AGM (Kubai y Auerbach 1983; Godlin y col. 1993; Medvinsky y col. 1993). Estas células madre hematopoyéticas posteriormente colonizan el hígado fetal, y alrededor del momento del nacimiento, las células madre desde el hígado colonizan la medula ósea, que luego llega ser el principal sitio de formación sanguínea durante la vida adulta. Una de las proteínas que distinguen a las primitivas HSC de las HSC definitivas (adulto) es **Hoxb-4**. La expresión de Hoxb-4 es crítica para la autorrenovación de las HSC adultas y la expresión de este gen en las HSC del saco vitelino les permite repoblar la médula ósea del adulto (en embriones irradiados experimentalmente), algo que las HSC primitivas de otro modo no pueden hacer (Antonchuk y col. 2002; Kyba y col. 2002).

Una de las grandes preguntas acerca del desarrollo sanguíneo tiene que ver con si la AGM es el sitio de producción de nuevas HSC o si éste sirve como reservorio para HSC producidas en otras partes (como en el mesodermo del saco vitelino). En el pollo, parece haber poca, si hubiera, contribución a la circulación adulta desde los islotes sanguíneos del saco vitelino, mientras que en *Xenopus*, cerca del 20% de las células sanguíneas parecen ser de origen embrionario. Pero en mamíferos, todavía no se sabe si las HSC embrionarias contribuyen a las células sanguíneas del adulto. Mientras que las HSC del saco vitelino no pueden repoblar directamente la médula ósea del adulto, parecen ser capaces de repoblar el hígado o médula ósea de ratones recién nacidos (Yoder y col. 1997) y pueden ser inducidas a convertirse en HSC definitivas si ellas entran en la AGM (Matsuoka y col. 2001). Por lo tanto, la AGM puede ser el sitio para la producción de nueva HSC como también el sitio que puede "actualizar" a las HSC hacia su nuevo ambiente adulto (Orkin y Zorn 2002).

Células madre comprometidas y sus destinos

La célula madre hematopoyética pluripotencial es una célula excepcional, en la que ésta es el precursor común de los glóbulos sanguíneos rojos (eritrocitos), de los glóbulos sanguíneos blancos (granulocitos, monocitos y linfocitos) y de las plaquetas (fragmentos citoplasmáticos derivados del megacariocito). Cuando son trasplantadas hacia un ratón endogámico irradiado (quien es generalmente idéntico a las células donantes y cuyas propias células han sido eliminadas por radiación), las HSC pluripotenciales pueden repoblar el ratón con todos los tipos celulares sanguíneos. Se estima que solo cerca de 1 de cada 10.000 células sanguíneas es una HSC pluripotencial (Berardi y col. 1995). Los descendientes de estas células se muestran en la figura 15-21.

La HSC pluripotencial (a veces denominada la CFU-M,L) parece ser dependiente del factor de transcripción SCL. Los ratones que carecen de esta proteína mueren debido a la ausencia de todos los linajes sanguíneos. SCL puede especificar al mesodermo ventral hacia un destino celular sanguíneo o puede permitir la formación o mantenimiento de las células HSC (Porcher y col. 1996; Robb y col. 1996).

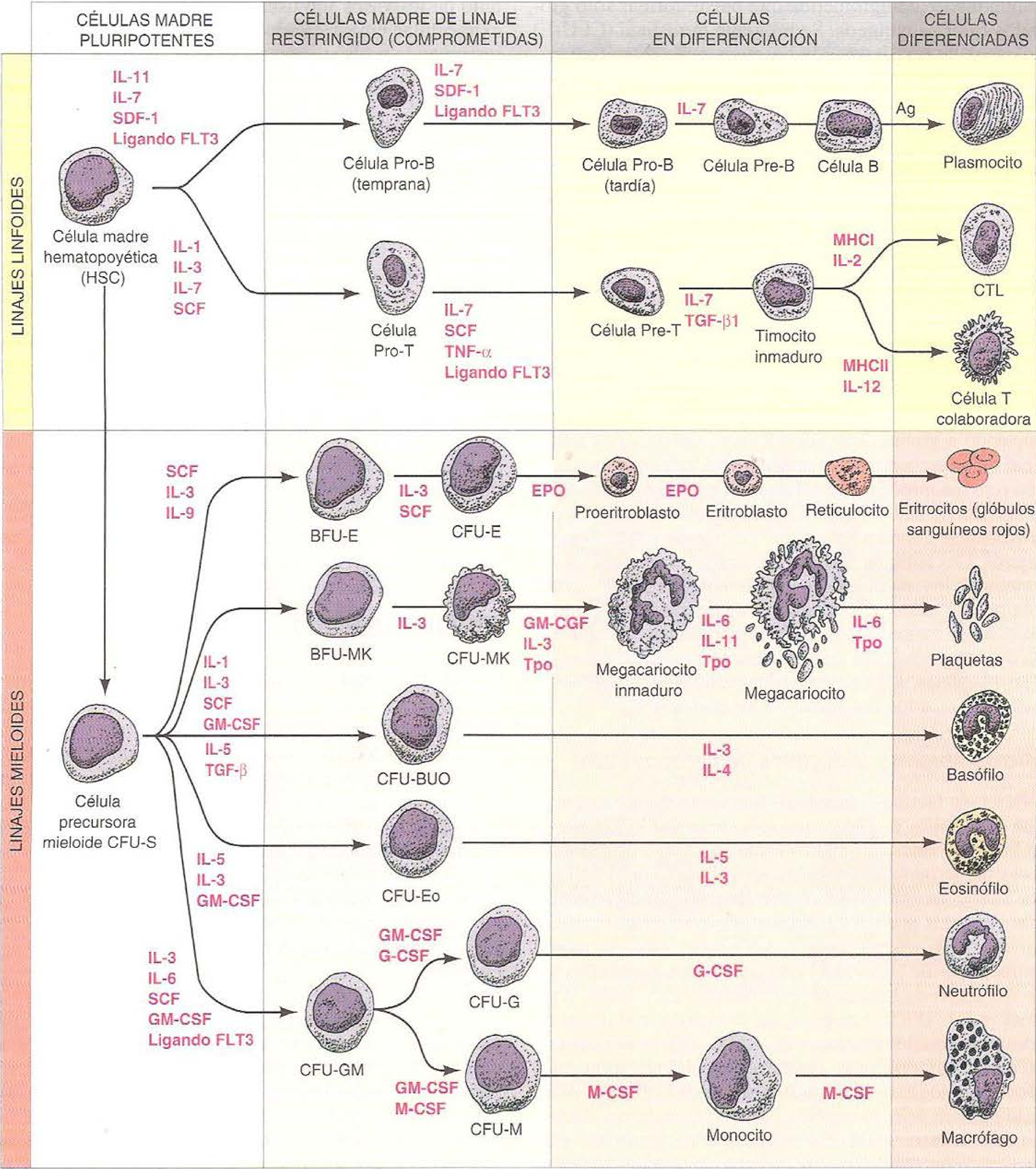


Fig. 15-21. Modelo para el origen de las células sanguíneas de mamíferos. (Otros modelos son consistentes con los datos y éste es uno que resume las características de varios modelos.) Los factores que afectan cada etapa de diferenciación se muestran en rojo. Ag, antígeno; EPO, eritropoyetina; G-CSF, factor estimulador de colonia granulocítica; GM-CSF, factor estimulador de colonia granulocito-macrófago; IL, interleucina; LIF, factor inhibidor de la leucemia; M-CSF, factor estimulador de colonias de macrófagos; MHCI, proteína del complejo mayor de hisotocompatibilidad tipo I; MHCII, proteína del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II; SCF, factor de célula madre; SDF-1, factor derivado del estroma-1; TNF, factor de necrosis tumoral; Tpo, trombopoyetina. (Según Nakauchi y Gachelin 1993; R&D Systems 1997.)

Las células HSC dan origen al **linaje de células madre restringidas** que producen células de las series mieloides (las células CFU-S) o de varios tipos de células madre linfoides. Las CFU-S son también pluripotentes debido a que su progenie, además, puede diferenciarse hacia numerosos tipos celulares. Sin embargo, la progenie inmediata de las CFU-S son las células madre de linaje restringido *comprometidas*. Cada una puede producir solo *un* tipo de célula además de renovarse a sí misma. Por ejemplo, la **célula precursora eritroide** (BFU-E) es una

célula madre comprometida que puede formar solo glóbulos rojos sanguíneos. Su progenie inmediata (CFU-E) es capaz de responder a la hormona **eritropoyetina** para producir el primer miembro diferenciado reconocible del linaje eritrocítico, el **proeritroblasto**, un precursor del glóbulo rojo sanguíneo. La eritropoyetina es una glucoproteína que induce rápidamente la síntesis de mRNA para globina (Krantz y Goldwasser 1965). Ésta es producida predominantemente en el riñón y su síntesis es dependiente de las condiciones ambientales. Si cae el nivel de oxígeno en la sangre, se incrementa la producción de eritropoyetina, llevando a la producción de más glóbulos rojos sanguíneos. A medida que madura el proeritroblasto, se convierte en un **eritroblasto**, que sintetiza enormes cantidades de hemoglobina. Finalmente, los eritroblastos de mamíferos expulsan su núcleo, convirtiéndose en **reticulocitos**. Los reticulocitos no pueden sintetizar más tiempo mRNA de globina, pero todavía pueden seguir traduciendo a globina los mensajeros existentes. El estadio final de diferenciación es el **eritrocito**, o glóbulo sanguíneo rojo maduro. En esta célula, no tiene lugar la división, la síntesis de RNA o la síntesis de proteínas. El DNA del eritrocito se condensa y posteriormente no produce mensajeros. Los anfibios, peces y aves conservan el núcleo no funcional; los mamíferos lo expulsan de la célula.* La célula deja la médula ósea e ingresa en la circulación, donde entrega oxígeno a los tejidos corporales. Del mismo modo, otras células madre de linaje restringido dan origen a las plaquetas, a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), a los linfocitos y a los monocitos.

Microambientes inductivos hematopoyéticos

Diferentes factores paracrinos son importantes en hacer que las células madre hematopoyéticas se diferencien a lo largo de vías particulares (véase fig. 15-21). Los factores paracrinos involucrados en la formación de glóbulos sanguíneos y linfocitos son denominados **citocinas**. Las citocinas pueden ser producidas por varios tipos celulares, pero son reunidas y concentradas por la matriz extracelular de las células estromales (mesenquimáticas) en los sitios de hematopoyesis (Hunt y col. 1987; Whitlock y col. 1987). Por ejemplo, el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor de crecimiento multilinaje interleucina 3 (IL-3) se unen al glucosaminoglucano heparán sulfato del estroma de la médula ósea (Gordon y col. 1987; Roberts y col. 1988). La matriz extracelular es luego capaz de presentar estos factores a las células madre en concentraciones suficientemente elevadas para unirse a sus receptores. En otro ejemplo, el factor de célula madre y VEGF responsable de la iniciación de la proliferación de las HSC y el endotelio de los vasos son usualmente amarrados a la matriz extracelular en un estado inutilizable. Las señales que instruyen la proliferación de las HSC y de los vasos sanguíneos a menudo liberan la metaloproteasa 9, que luego libera a VEGF y al factor de célula madre de la matriz extracelular (Heissig y col. 2002).

La vía de desarrollo tomada por los descendientes de una célula madre pluripotencial depende de qué factores de crecimiento encuentra y es por esta razón determinada por células estromales. Wolf y Trentin (1968) demostraron que interacciones de corto rango entre células estromales y células madre determinan los destinos de desarrollo de la progenie de células madre. Estos investigadores colocaron tapones de médula ósea en el bazo y luego inyectaron células madre en éste. Aquellas células CFU-S que fueron a residir en el bazo formaron colonias que eran predominantemente eritroides, mientras que las que fueron a residir en la médula ósea formaron colonias que fueron predominantemente granulocíticas. En realidad, las colonias que extendían los bordes a los dos tipos de tejidos fueron predominantemente eritroides en el bazo y granulocíticas en la médula ósea. Tales regiones de determinación son referidas como **microambientes inductivos hematopoyéticos (HIM)**.

ENDODERMO

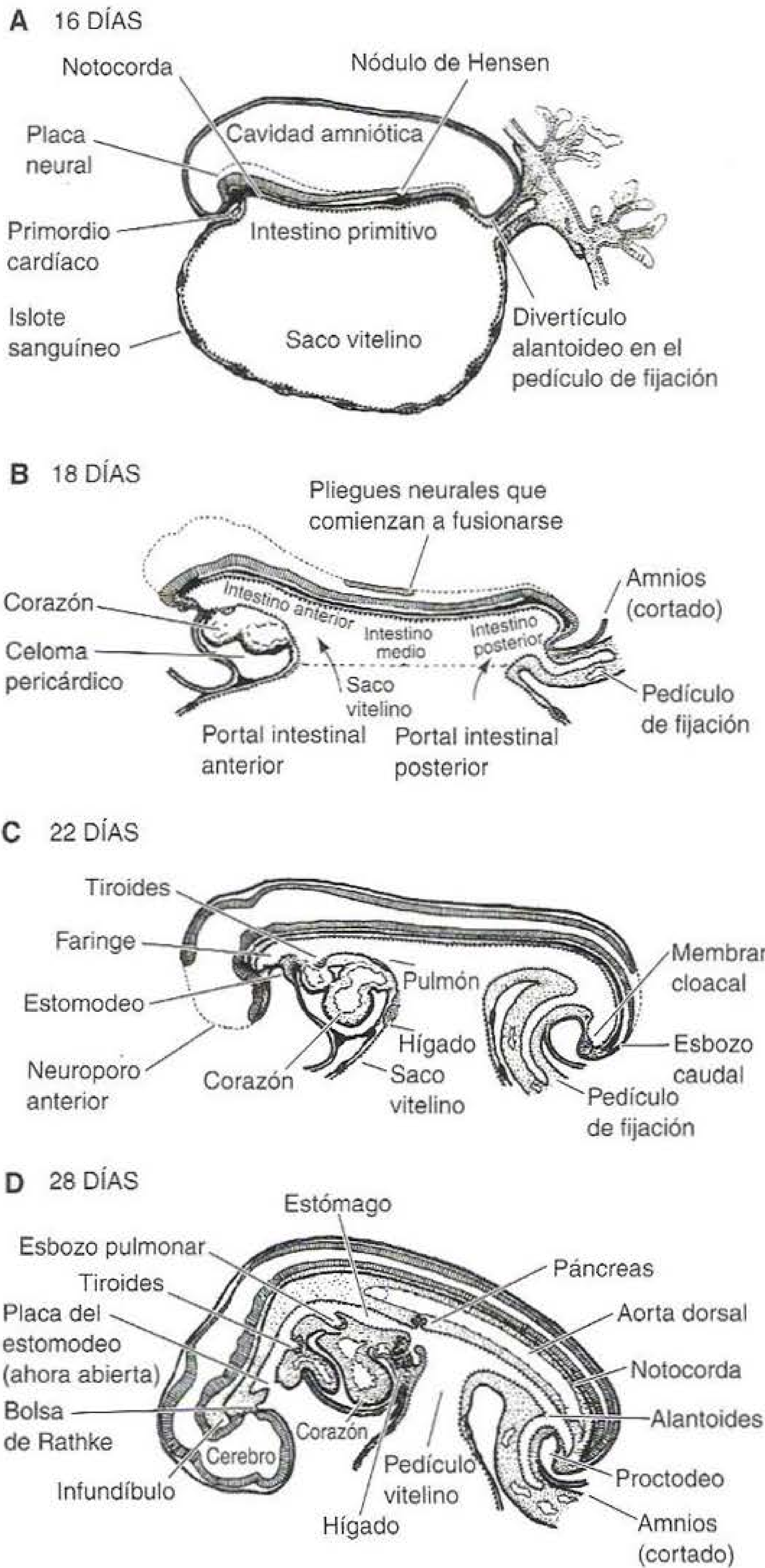
El endodermo tiene dos funciones principales. La primera función es inducir la formación de varios órganos mesodérmicos. Como se ha visto en este capítulo y en los anteriores, el endodermo es crítico para instruir la formación de la notocorda, el corazón, los vasos sanguíneos e incluso de la capa germinativa mesodérmica. La segunda función del endodermo embrionario es construir el revestimiento de dos tubos dentro del cuerpo de los vertebrados. El primer tubo, que se extiende a lo largo de la longitud corporal, es el **tubo digestivo.** Los esbozos desde este tubo forman el hígado, la vesícula biliar y el páncreas. El segundo tubo, el **tubo respiratorio**, se forma como una evaginación del tubo digestivo y finalmente se bifurca en dos pulmones. La región del tubo digestivo anterior al punto donde el tubo respiratorio se ramifica es denominada **faringe**. Las evaginaciones epiteliales de la faringe dan origen a las amígdalas y las glándulas tiroidea, tímica y paratiroideas y finalmente al mismo tubo respiratorio.

Los tubos respiratorio y digestivo son derivados del intestino primitivo (fig. 15-22). A medida que el endodermo es llevado hacia el centro del embrión, se forman las regiones del intestino anterior y del intestino posterior. Al principio, el extremo oral del intestino está bloqueado por una región en la que contactan el ectodermo con el endodermo denominada la **placa oral** o **del estomodeo***. Por último (aproximadamente a los 22 días en los embriones humanos), la placa del estomodeo se rompe y crea de este modo la apertura oral del tubo digestivo. La cavidad del

---

* En 1846, el joven Joseph Leidy (en ese momento un investigador de causas de fallecimiento, más tarde el biólogo más famoso en América) fue el primero en usar el microscopio para resolver un asesinato misterioso. Un hombre acusado de matar a un granjero de Filadelfia tenía sangre en sus ropas y en su hachuela. El sospechoso afirmaba que la sangre era de pollos que él había matado. Usando su microscopio, Leidy no encontró núcleos en esos eritrocitos. Además, halló que si dejaba eritrocitos de pollo fuera del cuerpo durante horas, éstos no perdían su núcleo. De esta manera, concluyó que las manchas de sangre no podían ser de pollo. El sospechoso entonces confesó (Warren 1998).

* *Nota del traductor:* el estomodeo es un espacio que está representado por una depresión ectodérmica, y uno de sus límites es el extremo rostral ciego del intestino anterior. En este límite contactan el ectodermo y el endodermo constituyendo la denominada membrana bucofaríngea también conocida como placa oral o del estomodeo.



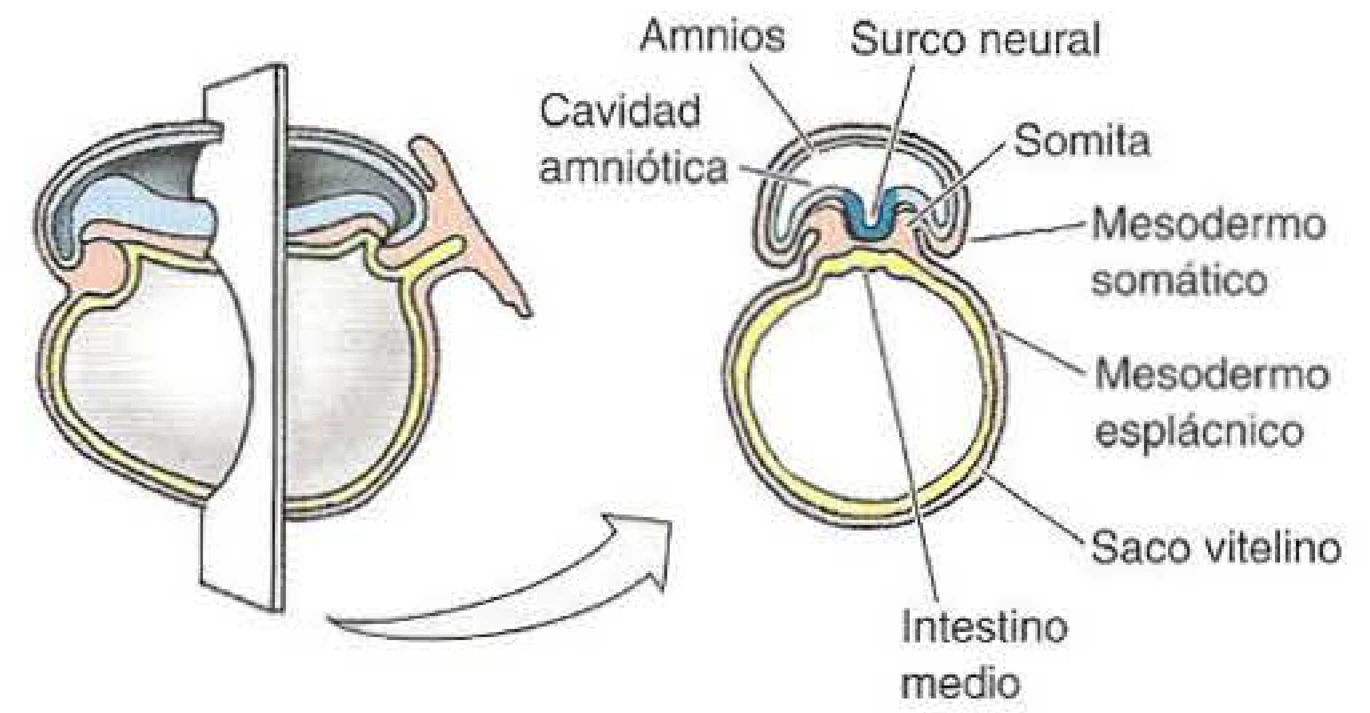
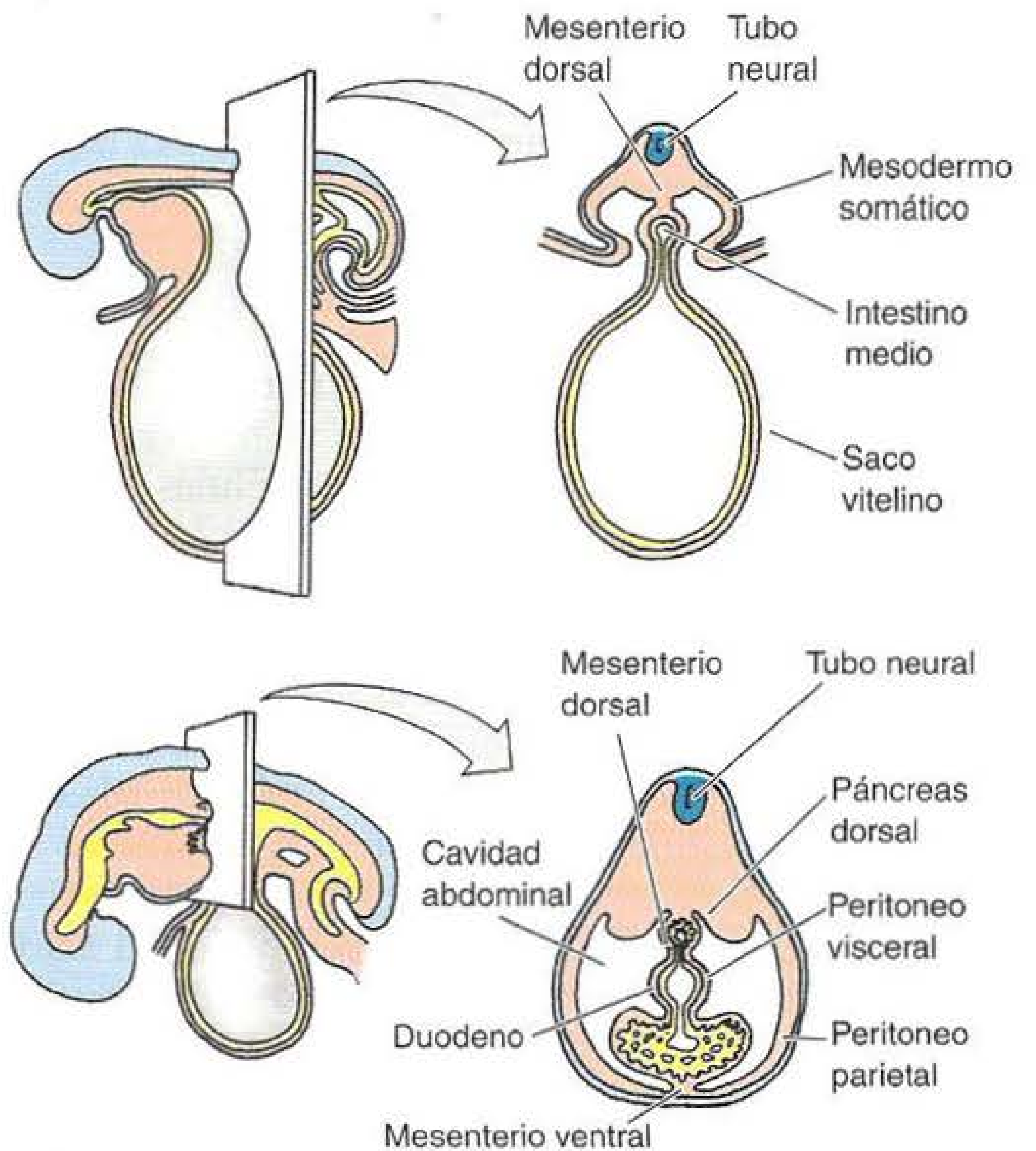


Fig. 15-22. Formación del aparato digestivo humano, representado alrededor de **A**, 16 días, **B**, 18 días, **C**, 22 días y **D**, 28 días. (Según Crelin 1961.)



estomodeo en sí misma está revestida por células ectodérmicas. Esta organización crea una situación interesante, debido a que el ectodermo del estomodeo está en contacto con el ectodermo del cerebro (ectodermo neural), que se ha curvado alrededor hacia la porción ventral del embrión. Estas dos regiones ectodérmicas interactúan entre sí. El techo de la región oral forma la **bolsa de Rathke** y se convierte en la parte *glandular* de la glándula hipófisis. El tejido neural sobre el piso del diencéfalo da origen al **infundíbulo**, que llega a ser la porción *neural* de la hipófisis. Por lo tanto, la glándula hipófisis tiene un origen doble, que se refleja en las funciones del adulto.

La faringe

La porción endodérmica anterior de los tubos digestivo y respiratorio comienzan en la faringe. Aquí, el embrión de mamíferos produce cuatro pares de **bolsas faríngeas** (fig. 15-23). Entre estas bolsas están los **arcos faríngeos.** El primer par de bolsas faríngeas se convierten en las cavidades del oído medio y las trompas de Eustaquio asociadas. El segundo par de bolsas da origen a la pared de las amígdalas. El timo es derivado del tercer par de bolsas faríngeas; éste dirigirá la diferenciación de los linfocitos T durante los estadios tardíos del desarrollo. Un par de glándulas paratiroides es derivado del tercer par de bolsas faríngeas y el otro par es derivado de la cuarta. Además de estas bolsas pares, se forma un pequeño divertículo central entre la primera y la segunda bolsa faríngea sobre el piso de la faringe. Esta evaginación de endodermo y mesénquima se separará de la faringe y migrará descendiendo hacia el cuello para llegar a ser la glándula tiroides. El tubo respiratorio brota del piso faríngeo, a nivel del cuarto par de bolsas faríngeas para formar los pulmones como se verá más adelante.

El tubo digestivo y sus derivados

Caudal a la faringe, el tubo digestivo se estrecha para formar el esófago, que es seguido en secuencia por el estó-

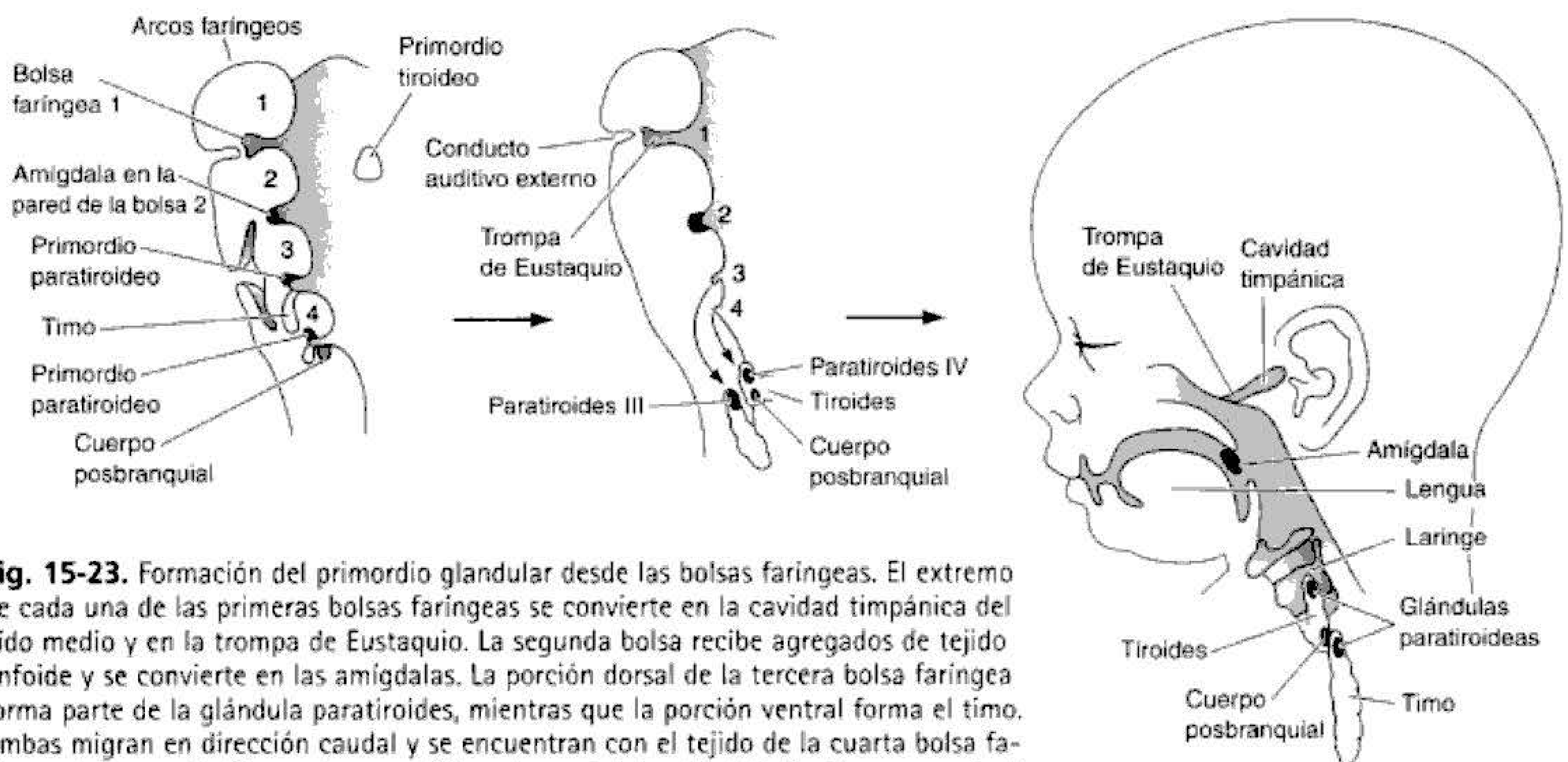


Fig. 15-23. Formación del primordio glandular desde las bolsas faríngeas. El extremo de cada una de las primeras bolsas faríngeas se convierte en la cavidad timpánica del oído medio y en la trompa de Eustaquio. La segunda bolsa recibe agregados de tejido linfoide y se convierte en las amígdalas. La porción dorsal de la tercera bolsa faríngea forma parte de la glándula paratiroides, mientras que la porción ventral forma el timo. Ambas migran en dirección caudal y se encuentran con el tejido de la cuarta bolsa faríngea de la paratiroides y el cuerpo último branquial. La glándula tiroides, que se había originado en la línea media de la faringe, también migra en sentido caudal hacia la región del cuello. (Según Carlson 1999.)

mago, el intestino delgado y el intestino grueso. Las células endodérmicas generan solamente el revestimiento del tubo digestivo y de sus glándulas; las células mesenquimáticas desde la porción esplácnica de la lámina del mesodermo lateral rodearán al tubo digestivo proporcionando los músculos para la peristalsis.

Como muestra la figura 15-23, el estómago se desarrolla como una región dilatada del intestino cerca del esófago. Más caudalmente se desarrolla el intestino y la conexión entre el intestino y el saco vitelino finalmente se separa. En el extremo caudal del intestino, se forma una depresión donde el endodermo se encuentra con el ectodermo que lo recubre. Aquí, una delgada **membrana cloacal** separa los dos tejidos. Esta finalmente se rompe y forman la apertura que se convertirá en el ano.

Especificación del tejido intestinal

A medida que se forma el tubo endodérmico en los tetrápodos, el epitelio endodérmico es capaz de responder de modo diferente a distintos mesénquimas mesodérmicos regionalmente específicos. Estas respuestas le permiten al tubo digestivo y al tubo respiratorio desarrollar diferentes estructuras en distintas regiones. Por lo tanto, a medida que el tubo digestivo encuentra diferentes mesénquimas se diferencia hacia esófago, estómago, intestino delgado y colon (Okada 1960; Gumpel-Pinot y col. 1978; Fukumachi y Takayama 1980; Kedinger y col. 1990). El endodermo y la hoja esplácnica del mesodermo lateral experimentan un complicado grupo de interacciones. Sin embargo, investigaciones recientes sobre la formación del intestino en pollo y en rana están llevando a un consenso sobre las etapas que regionalizan al tubo digestivo (Ishii y col. 1997; Horb y Slack 2001; Matsushita y col. 2002). Incluso el tubo digestivo del pez cebra, que se forma a partir del montaje de primordios de órganos individuales (en lugar de originados de un solo tubo digestivo) comparte los mismos programas moleculares para la generación de los diferentes tejidos del tubo digestivo (Wallace y Pack 2003).

El intestino parece ser especificado regionalmente en un estadio muy temprano. En efecto, en el pollo, el endodermo parece ser especificado de manera regional incluso antes de que éste forme un tubo. En este momento, el endodermo expresa un grupo de factores de transcripción que son regionalmente específicos. Por ejemplo, en el embrión de pollo de 1,5 días, *CdxA*, un homólogo del gen *Caudal* de *Drosophila*, es expresado en la región que será el intestino, mientras que *cSox2* es expresado en los precursores del estómago y esófago (Matsushita y col. 2002). La expresión de éstos y de otros factores de transcripción estará conservada durante el desarrollo del tubo digestivo (fig. 15-24).

Sin embargo, esta especificación regional del tubo digestivo todavía es inestable y los límites entre las regiones son inciertos. La estabilización de estos límites resulta de la interacción con el mesodermo. A medida que el tubo digestivo comienza a formarse en los extremos anterior y posterior, induce al mesodermo esplácnico a ser regionalmente específico. Roberts y colegas (1988, 1995) han involucrado a la proteína Sonic hedgehog (Shh) en esta especificación. Temprano en el desarrollo, la expresión de Shh está limitada al endodermo posterior del intestino posterior y de la faringe del pollo. A medida que el tubo se extiende hacia el centro del embrión, los dominios de expresión de Shh se incrementan, extendiéndose finalmente a través del endodermo del tubo digestivo. Shh es secretado en diferentes concentraciones en distintos sitios y su blanco parece ser el mesodermo que rodea al tubo digestivo. La secreción de Shh por el endodermo del intestino posterior induce un patrón anidado de expresión de gen Hox "posterior" en el mesodermo. Como en las vértebras (véase cap. 11), los bordes anteriores de expresión del gen Hox definen los límites morfológicos de las regiones que formarán la cloaca, el intestino grueso, el ciego, el ciego medio (en el borde in-

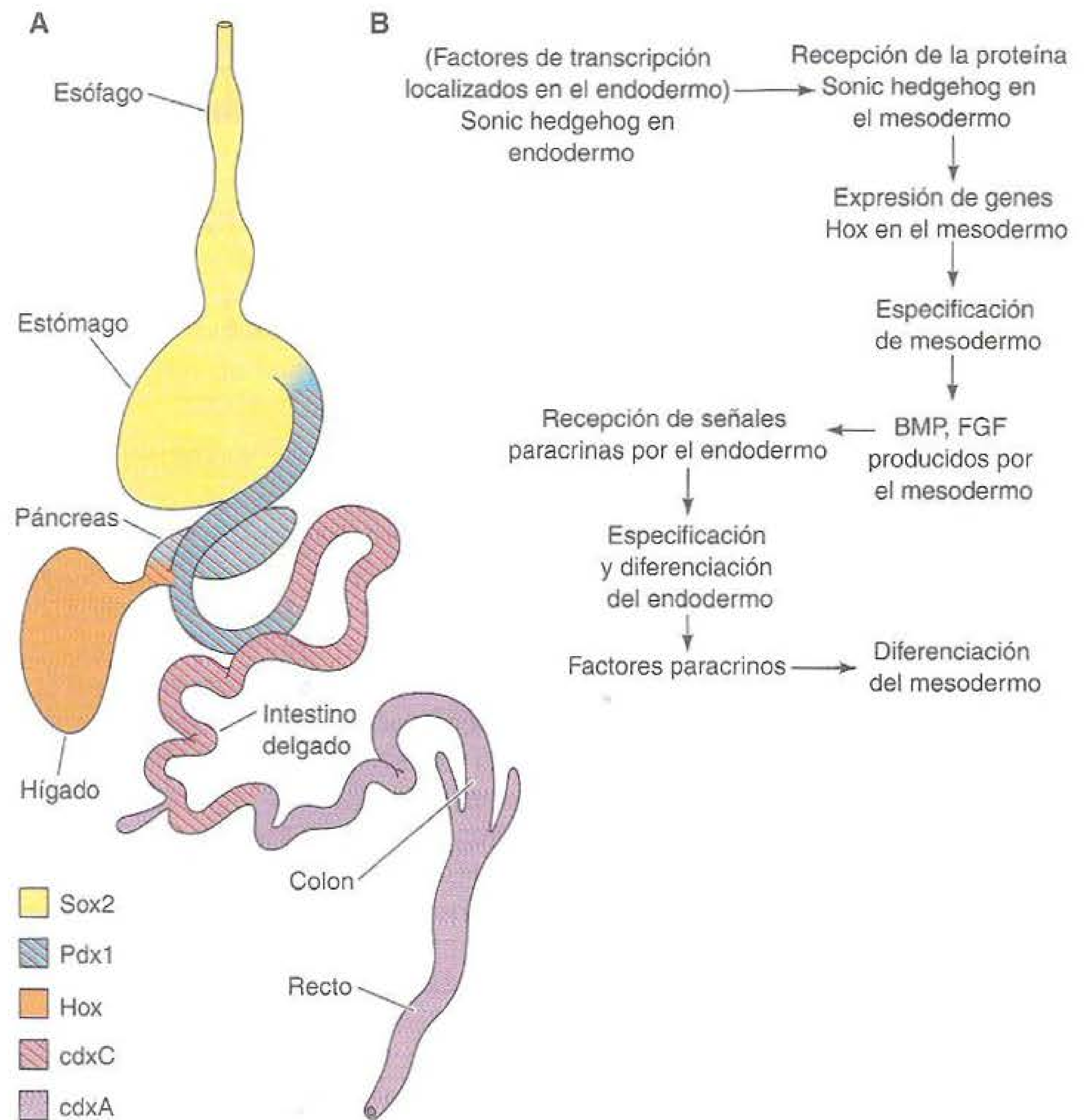


Fig. 15-24. Especificación regional del endodermo del intestino y del mesodermo esplácnico mediante interacciones recíprocas. **A.** Factores de transcripción regionales del endodermo del intestino de pollo (maduro). Estos factores se ven previo a las interacciones con el mesodermo, pero no están estabilizados. **B.** Camino posible de las interacciones entre el endodermo y el mesodermo esplácnico. (A, según Grapin-Botton y col. 2001.)

testino medio/intestino posterior) y la porción posterior del intestino medio (Roberts y col. 1995; Yokouchi y col. 1995). Cuando virus que expresan Hox causan la expresión ectópica de estos genes Hox en el mesodermo, las células del mesodermo alteran la diferenciación del endodermo adyacente (Roberts y col. 1998). Se piensa que los genes Hox especifican al mesodermo de modo tal que éste puede interactuar con el tubo endodérmico y especificar sus regiones. Una vez que son establecidos los límites de los factores de transcripción, la diferenciación puede comenzar.

Hígado, páncreas y vesícula biliar

El endodermo también forma el revestimiento de tres órganos accesorios que se desarrollan inmediatamente caudal al estómago. El **divertículo hepático** es un tubo de endodermo que se extiende desde el intestino anterior hacia el mesénquima que lo rodea. El mesénquima induce a este endodermo a proliferar, ramificarse y a formar el epitelio glandular del hígado. Una porción del divertículo hepático (la región próxima al tubo digestivo) continúa funcionando como conducto de drenaje del hígado y una rama desde este conducto produce la vesícula biliar (fig. 15-25).

El páncreas se desarrolla a partir de la fusión de un divertículo dorsal y uno ventral diferentes. Ambos primordios se originan del endodermo inmediatamente caudal al estómago y a medida que ellos crecen, se acercan y finalmente se fusionan. En humanos, solo sobrevive el conducto ventral transportando enzimas digestivas hacia el intestino. En otras especies (como el perro), los conductos dorsal y ventral se vacían en el intestino.

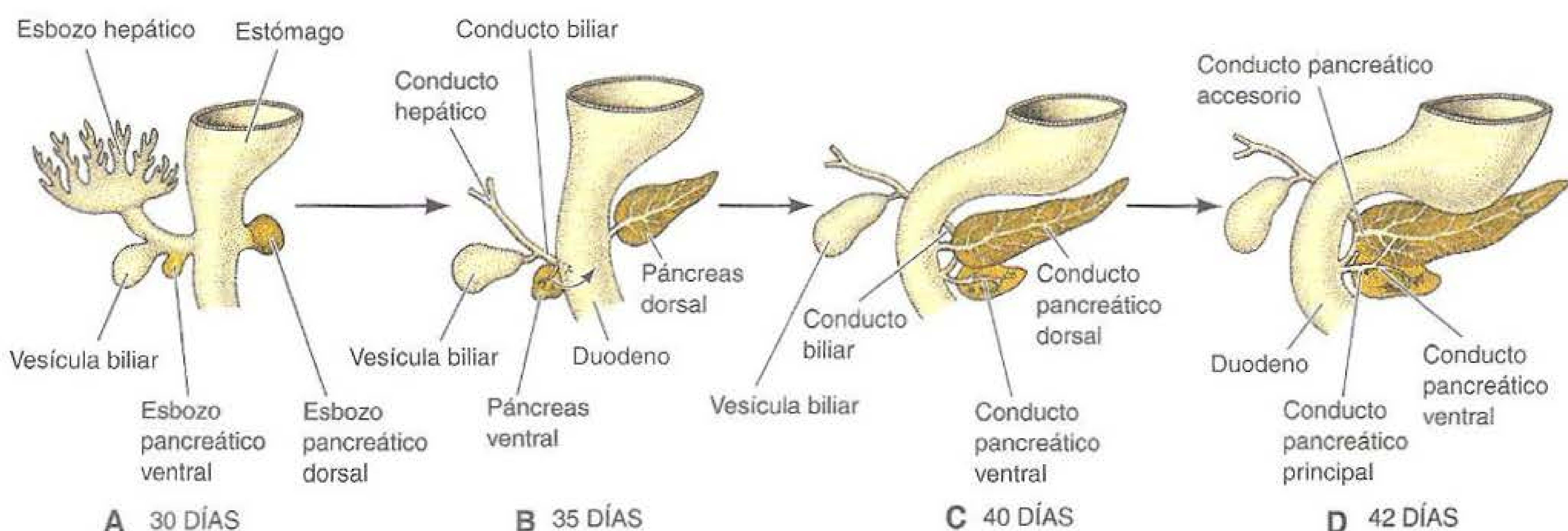


Fig. 15-25. Desarrollo pancreático humano. **A.** A los 30 días, el esbozo pancreático ventral está próximo al primordio hepático. **B.** Hacia los 35 días, comienza a migrar hacia posterior, y **C**, contacta con el esbozo pancreático dorsal durante la sexta semana de desarrollo. **D.** En la mayoría de los individuos, el esbozo pancreático dorsal pierde su conducto hacia el duodeno; sin embargo, en cerca del 10% de la población persiste el doble sistema de conductos. (Según Langman 1981.)

Información adicional y especulaciones

Sangre e intestino: la especificación del hígado y del páncreas

Hay una íntima relación entre la hoja esplácnica del mesodermo lateral y el endodermo del intestino anterior. Así como el endodermo del intestino anterior es crítico en la especificación del mesodermo cardiogénico, las células endoteliales de los vasos sanguíneos inducen al tubo endodérmico a producir el primordio hepático y el esbozo pancreático.

Formación del hígado

La expresión de genes específicos del hígado (como los genes para α-proteína y albúmina) puede producirse en cualquier lugar del tubo digestivo, si este tubo es expuesto a mesodermo cardiogénico. Sin embargo, esta inducción puede producirse solamente si la notocorda es extirpada. Si se coloca notocorda en la porción de endodermo normalmente inducido por el mesodermo cardiogénico a ser hígado, el endodermo no formará tejido hepático. Por esta razón, el corazón en desarrollo parece inducir la formación de hígado, mientras que la presencia de notocorda inhibe la formación de hígado (fig. 15-26). Esta inducción probablemente es debida a FGF secretado por las células cardíacas en desarrollo (Le Douarin 1975; Gualdi y col. 1996; Jung y col. 1999).

Sin embargo, Matsumoto y col. (2001) hallaron que el corazón no es el único derivado mesodérmico necesario para formar el hígado. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos también son críticas. Si las células endoteliales no están presentes en el área alrededor de la región hepática del tubo digestivo, el esbozo hepático no se forma. Esta inducción se produce incluso antes de que las células endoteliales hayan formado tubos, de modo tal que esta inducción no tiene relación alguna con darle nutrientes u oxígeno a esta región. Por lo tanto, las células endoteliales de los vasos sanguíneos tienen una función de desarrollo además de sus papeles circulatorios: ellas inducen la formación del esbozo hepático.

Formación del páncreas

La formación del páncreas puede ser la otra cara de la formación del hígado. Mientras que las células del corazón promueven y la notocorda impide la formación del hígado, la notocorda puede promover activamente la formación del páncreas y el corazón puede bloquear la formación del páncreas. Se ha postulado la hipótesis (Gannon y Wright 1999) de que la expresión de Pdx1 en el endodermo le otorga a una región particular del tubo digestivo (incluyendo futuras porciones de los esbozos del estómago, del duodeno, del hígado y del páncreas) la capacidad para llegar a ser páncreas o hígado. Un grupo de condiciones (presencia de corazón, ausencia de notocorda) induce al hígado, mientras que otro grupo de condiciones (presencia de notocorda, ausencia de corazón) lleva a la formación de páncreas.

La notocorda activa el desarrollo del páncreas al reprimir la expresión del gen *Sonic hedgehog* en el endodermo (Apelqvist y col. 1997; Hebrok y col. 1998). (Éste fue un hallazgo sorprendente, debido a que como se vio en el capítulo 13 la notocorda es la fuente de la proteína Sonic Hedgehog y un inductor de la posterior expresión del gen *shh* en los tejidos ectodérmicos.) Sonic hedghog es expresado en todo el endodermo del tubo digestivo, excepto en la región que formará el páncreas. La notocorda en esta región del embrión secreta FGF2 y activina, que son capaces de regular en menos la expresión de *shh* en el endodermo. Si *shh* es expresado experimentalmente en esta región, el tejido vuelve a ser intestinal (Jonnson y col. 1994; Ahlgren y col. 1996; Offield y col. 1996).

La carencia de Shh en esta región del intestino parece permitirle a ésta responder a señales que vienen desde el endotelio de los vasos sanguíneos. En efecto, el desarrollo pancreático es iniciado precisamente en aquellas tres localizaciones donde el endodermo del intestino anterior contacta al endotelio de los vasos sanguíneos principales. Es en estos puntos –donde el tubo endodérmico se encuentra con la aorta y las venas vitelinas– que el factor de transcripción Pdx1 es expresado (fig. 15-27A, B; Lammert y col. 2001). Si los vasos sanguíneos son extirpados de esta área, las regiones de expresión de Pdx1 no se forman y el endodermo pancreático falla en formar un esbozo; si se forman más vasos sanguíneos en esta área, más tubo endodérmico llega a ser tejido pancreático.

La asociación de tejidos pancreáticos con vasos sanguíneos es crítica en la

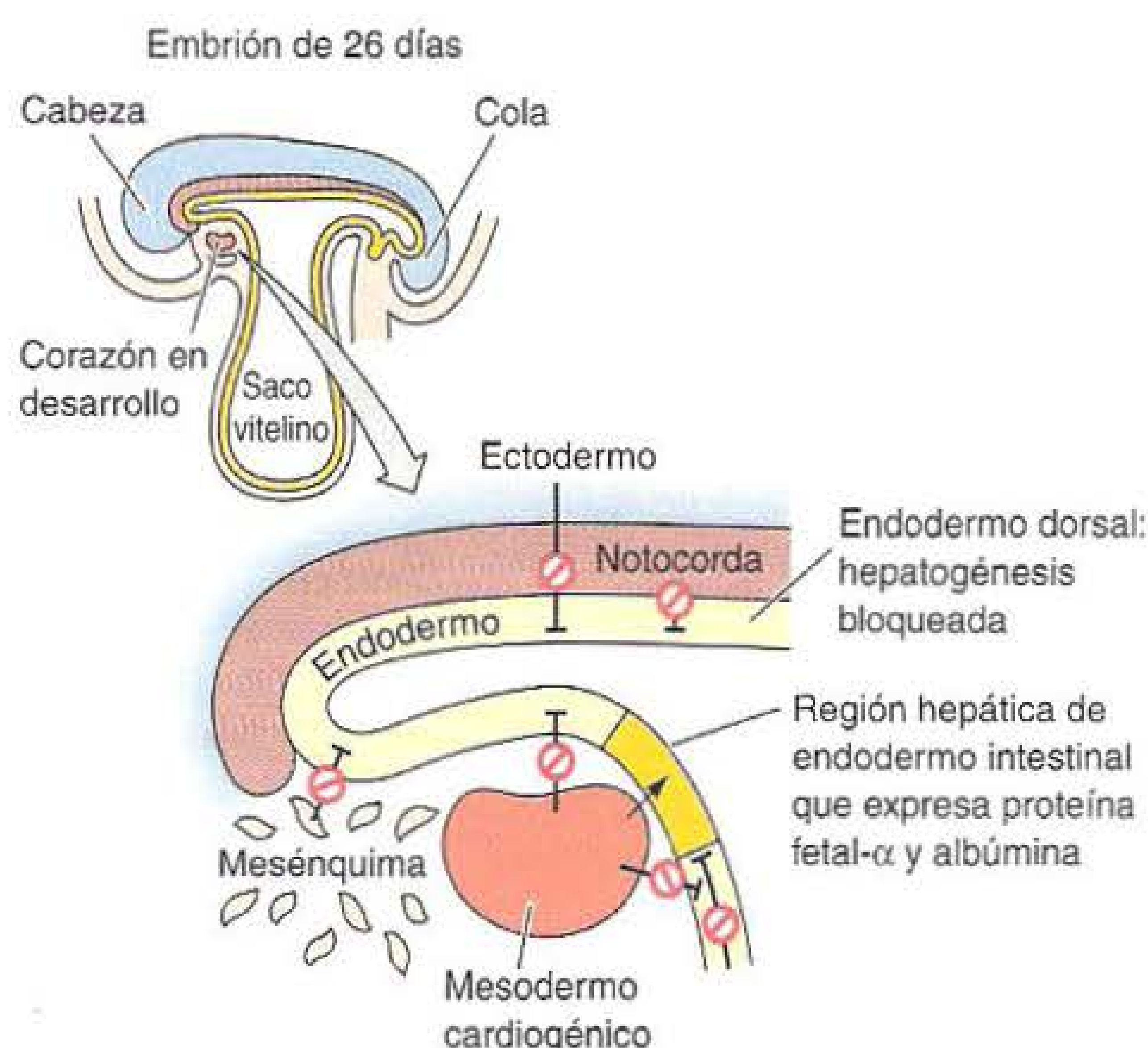


Fig. 15-26. Señalización positiva y negativa en la formación del endodermo hepático (hígado). El ectodermo y la notocorda bloquean la capacidad del endodermo para expresar genes específicos del hígado. El mesodermo cardiogénico, probablemente a través de FGF1 o FGF2, promueve la transcripción de genes específicos del hígado mediante el bloqueo de factores inhibidores inducidos por el tejido que lo rodea (líneas con barras). (Según Gualdi y col. 1996.)

formación de células secretoras de insulina del páncreas. El gen *pdx1* parece actuar en coordinación con otro gen, *ngn3*, para formar las células endocrinas del páncreas, los islotes de Langerhans. Las células exocrinas (que producen enzimas digestivas tales como quimotripsina) y las células endocrinas parecen tener el mismo progenitor (Fishman y Melton 2002). Los islotes de células secretan VEGF para atraer vasos sanguíneos y estos vasos rodean a los islotes en desarrollo (fig. 15-27D).

El factor de transcripción Pdx1 es excepcionalmente importante en el desarrollo pancreático. Pdx1 provoca la formación del esbozo desde el epitelio del tubo digestivo, reprime la *expresión* de genes que son característicos de otras regiones del tubo digestivo, mantiene la represión de Sonic hedgehog, inicia (pero no completa) la diferenciación celular del islote y es necesario (pero no suficiente) para la expresión del gen de la insulina (Grapin-Botton y col. 2001). Con el uso de un sistema inducible Cre-Lox para marcar las células de la progenie que expresan NGN3 o Pdx1, Gu y colegas (2002) demostraron que las células que están expresando NGN-3 son específicamente progenitoras de células del islote, mientras que las células que están expresando el gen *pdx1* dan origen a los tres tipos de tejido pancreático (exocrino, endocrino y células de los conductos) (fig. 15-27E). Además, Horb y col. (2003) han demostrado que Pdx1 puede reespecificar el tejido hepático en desarrollo hacia páncreas. Cuando a los renacuajos de *Xenopus* se les dio en las células hepáticas un gen *pdx1* unido a un promotor activo, la proteína Pdx1 se produjo en el hígado y el hígado se convirtió a páncreas con células exocrinas y endocrinas.

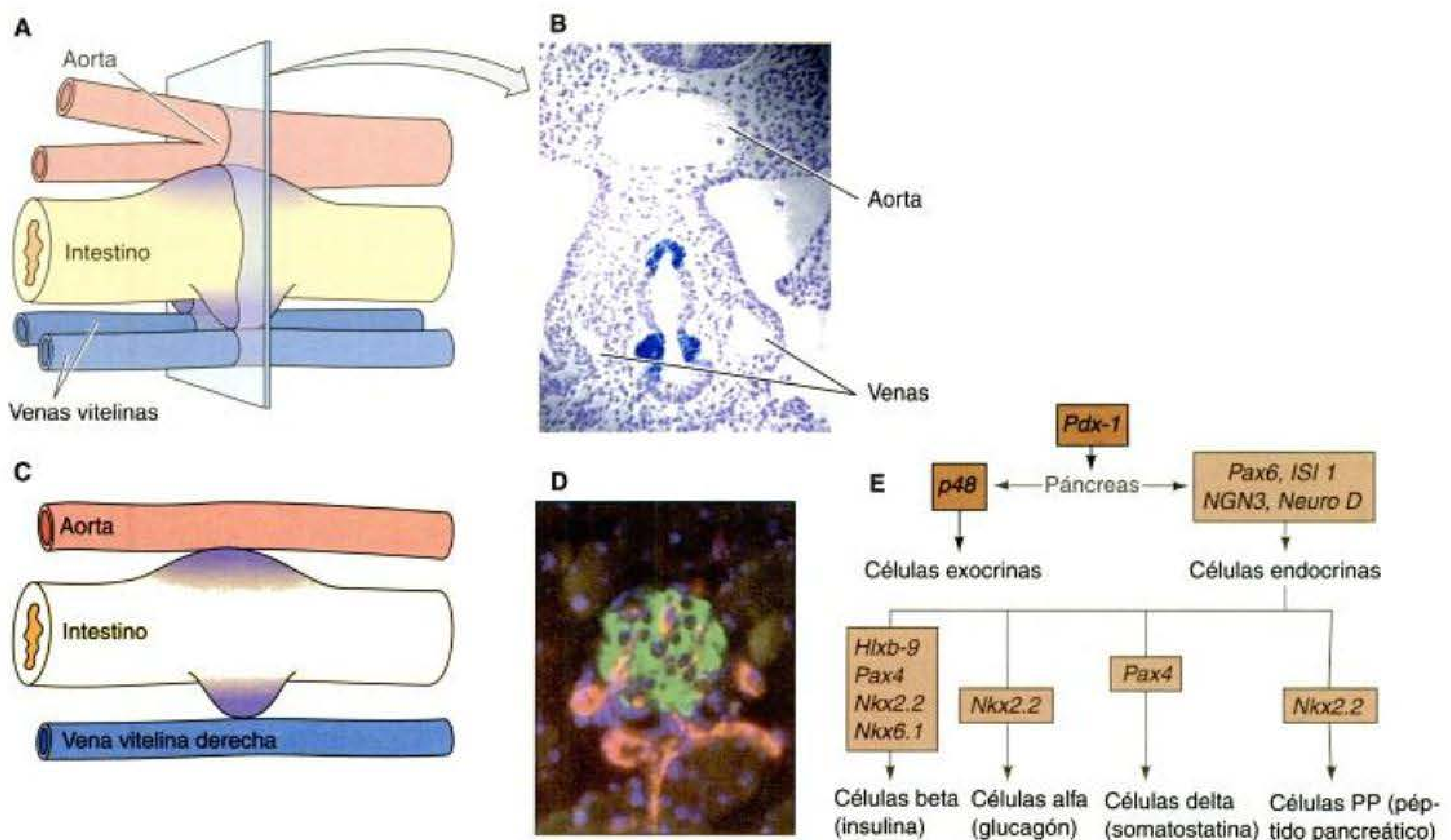


Fig. 15-27. Inducción de la expresión del gen *pdx1* en el epitelio del intestino. **A.** En el embrión de pollo, *pdx1* (violeta) que es expresado en el tubo digestivo es inducido por el contacto con la aorta y las venas vitelinas. Las regiones de expresión de *pdx1* crean los esbozos dorsal y ventral del páncreas. **B.** Hibridación in situ del mRNA de *pdx1* en una sección a través de la región de contacto entre los vasos sanguíneos y el tubo digestivo. Las regiones de expresión de *pdx1* se muestran como azul oscuro. **C.** En el embrión de ratón, solo sobrevive la vena vitelina derecha y contacta al endotelio intestinal. La expresión de pdx es vista solamente sobre este lado y solo surge un esbozo pancreático ventral. **D.** Los vasos sanguíneos (teñidos de rojo con anticuerpos para PECAM1) dirigen a los islotes (teñidos de verde con anticuerpos para insulina) a diferenciarse. Los núcleos están teñidos de azul con DAPI. **E.** Linaje de células pancreáticas. Todas las células pancreáticas expresan *pdx1*. Las células que están expresando NGN-3 forman los linajes endocrinos. (**A-C**, según Lammert y col. 2001; **D**, según Grapin-Botton y col. 2001; microfotografías cortesía de E. Lammert y D. A. Melton.)

El tubo respiratorio

Los pulmones son un derivado del tubo digestivo, aún cuando ellos no participan en el papel de la digestión. En el centro del piso de la faringe, a nivel del cuarto par de bolsas faríngeas, el **surco laringotraqueal** se extiende ventralmente (fig. 15-28). Este surco luego se bifurca en dos ramas que forman bronquios y pulmones pares. El endodermo laringotraqueal se convierte en el revestimiento de la tráquea, los dos bronquios y los sacos aéreos (alvéolos) de los pulmones. A veces esta separación no es completa y los recién nacidos tienen una conexión entre los dos tubos. Esta anomalía digestiva y respiratoria es denominada **fístula traqueoesofágica**, y se repara qui-

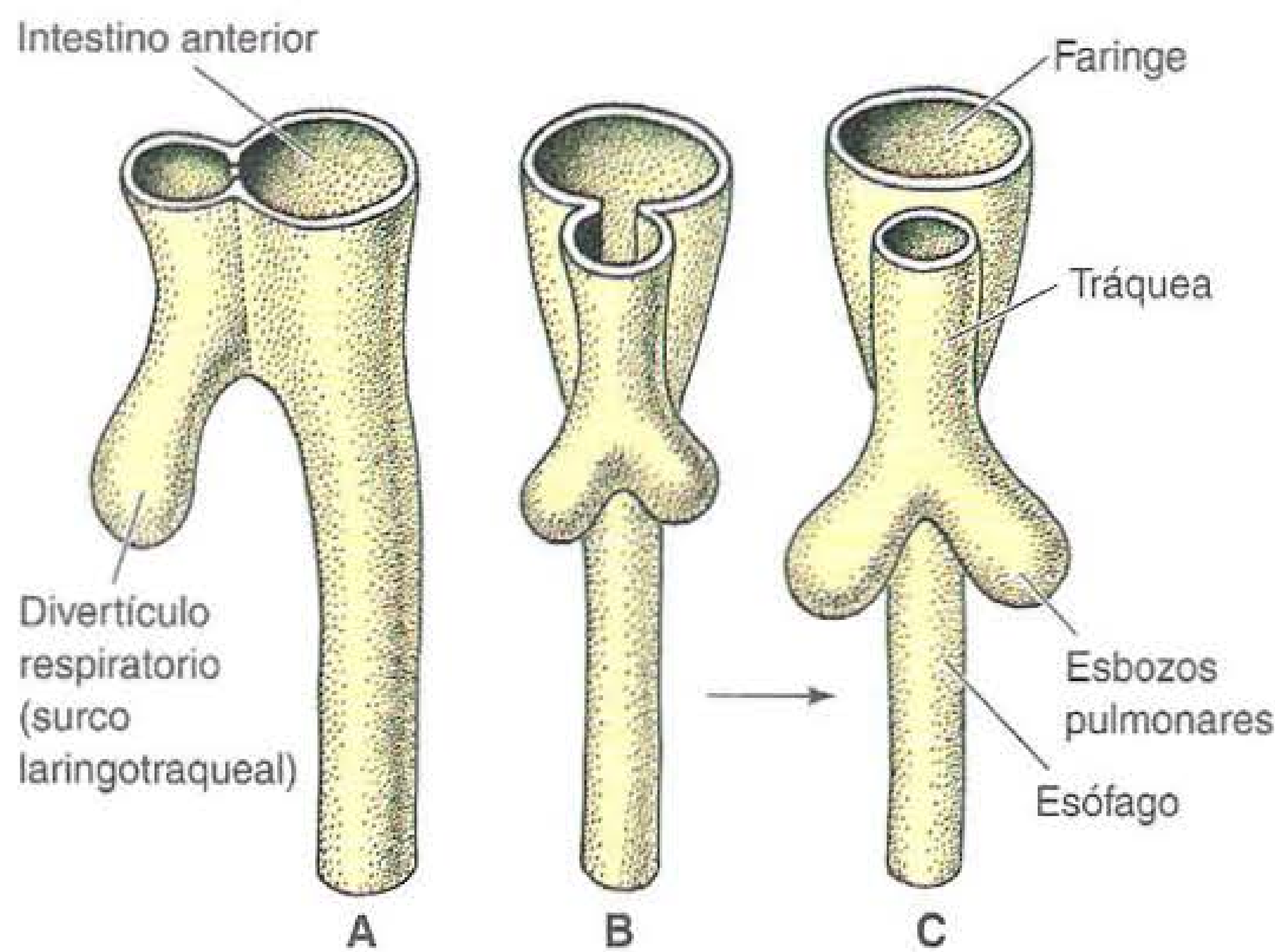


Fig. 15-28. Tabicamiento del intestino anterior en esófago y divertículo respiratorio durante la tercera y cuarta semanas de la gestación humana. A, B. Vistas lateral y ventral, al final de la tercera semana. C. Vista ventral, cuarta semana. (Según Langman 1981.)

rúrgicamente de modo tal que el recién nacido pueda respirar y tragar apropiadamente.

La producción del surco laringotraqueal está correlacionada con la presencia del factor de transcripción Tbx4 en el endodermo visceral. Tbx4 parece inducir la formación de la evaginación y diferenciación del tubo respiratorio y la inhibición de Tbx4 da como consecuencia la falla de la formación del esbozo pulmonar (Sakiyama y col. 2003).

Los pulmones están entre los últimos órganos de mamíferos en diferenciarse completamente. Los pulmones deben ser capaces de suministrar el oxígeno en la primera respiración del recién nacido. Para llevar a cabo esto, las células alveolares secretan surfactante en el fluido que baña los pulmones. Este surfactante, que consiste en fosfolípidos tales como esfingomielina y lecitina, es secretado muy tarde en la gestación y, por lo general, alcanza niveles fisiológicos útiles cerca de la semana 34 de la gestación humana. El surfactante le permite a las células alveolares que se toquen entre sí sin pegarse. Por lo tanto, los nacidos prematuramente a menudo tienen dificultades respiratorias y tienen que ser colocados en respiradores hasta que maduren sus células productoras de surfactante.

Como en el tubo digestivo, la especificidad regional del mesénquima determina la diferenciación del tubo respiratorio en desarrollo. En el mamífero en desarrollo, el epitelio respiratorio responde de dos modos distintos. En la región del cuello, éste crece en línea recta, formando la tráquea. Luego ingresa al tórax, se ramifica, para formar dos bronquios y luego los pulmones. El epitelio respiratorio de un embrión de ratón puede ser aislado poco tiempo después de que éste se ha separado en dos bronquios y los dos lados pueden ser tratados de modo diferente. La figura 15-29 muestra el resultado de tal experimento. Al epitelio bronquial derecho se le permitió conservar su mesénquima pulmonar, mientras que el bronquio izquierdo fue rodeado con mesénquima traqueal (Wessells 1970). El bronquio derecho prolifera y se ramifica bajo la influencia del mesénquima pulmonar, mientras que el bronquio izquierdo continúa creciendo sin ramificarse. Además, la diferenciación del epitelio respiratorio a células de la tráquea o a células del pulmón depende del mesénquima con el que ésta se encuentra (Shannon y col. 1998).

SITIO WEB 15.5 **Inducción del pulmón (Induction of the lung).** La inducción del pulmón involucra el interjuego entre FGF y Shh. Sin embargo, éste parece ser diferente de la inducción del páncreas y del hígado.

Las membranas extraembrionarias

En reptiles, aves y mamíferos el desarrollo embrionario ha tomado una nueva dirección evolutiva: el huevo de amniotas (véase fig. 2-22). Los reptiles evolucionaron un mecanismo para depositar huevos sobre la tierra seca; esta adaptación les dio la libertad para explorar nichos que no se hallaban próximos al ambiente acuático. Para sobrellevar estos cambios de desarrollo terrestre, el embrión produce cuatro grupos de membranas extraembrionarias que median entre éste y el ambiente (véase cap. 11). Incluso cuando la mayoría de los mamíferos evolucionaron una placenta que reemplazó la cáscara del huevo, el patrón básico de las membranas extraembrionarias siguió siendo el mismo.

En los reptiles, aves y mamíferos en desarrollo inicialmente no hay una distinción entre dominios embrionarios y extraembrionarios. Sin embargo, a medida que el cuerpo del embrión toma forma, el epitelio en el borde entre el embrión y el dominio extraembrionario se divide desigualmente para crear pliegues corporales que aíslan al embrión del vitelo y definen qué áreas serán embrionarias y cuáles extraembrionarias (Miller y col. 1994, 1999). Es-

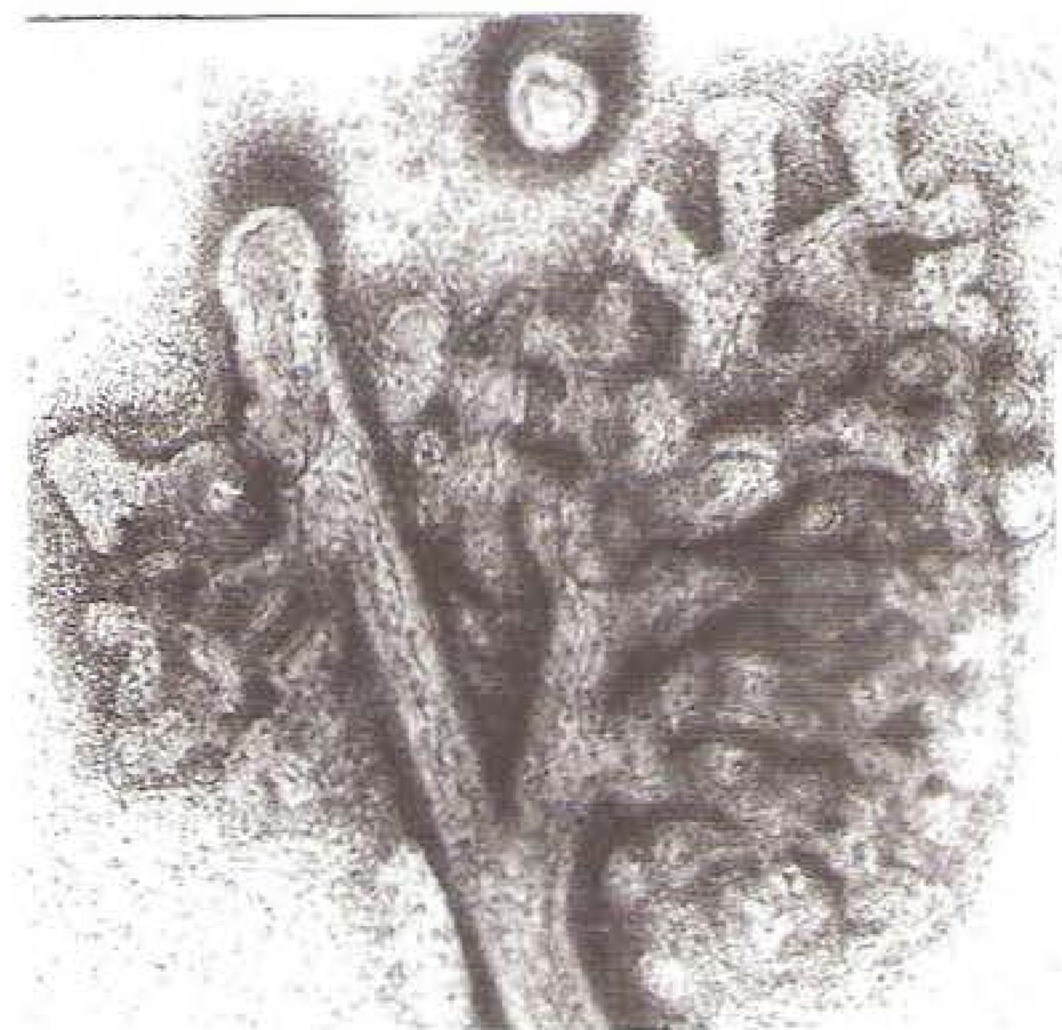


Fig. 15-29. Capacidad del epitelio pulmonar presuntivo para diferenciarse con respecto a la fuente de mesénquima inductivo. Después de que el epitelio pulmonar del ratón embrionario se había ramificado en dos bronquios, se extirpó y cultivó todo el esbozo. El bronquio derecho se dejó sin tocar, mientras que el extremo del bronquio izquierdo fue cubierto con mesénquima traqueal. El extremo del bronquio derecho formó las ramificaciones características del pulmón, mientras que casi no se produjeron ramificaciones en el extremo del bronquio izquierdo. (De Wessells 1970; microfotografía cortesía de N. Wessells.)

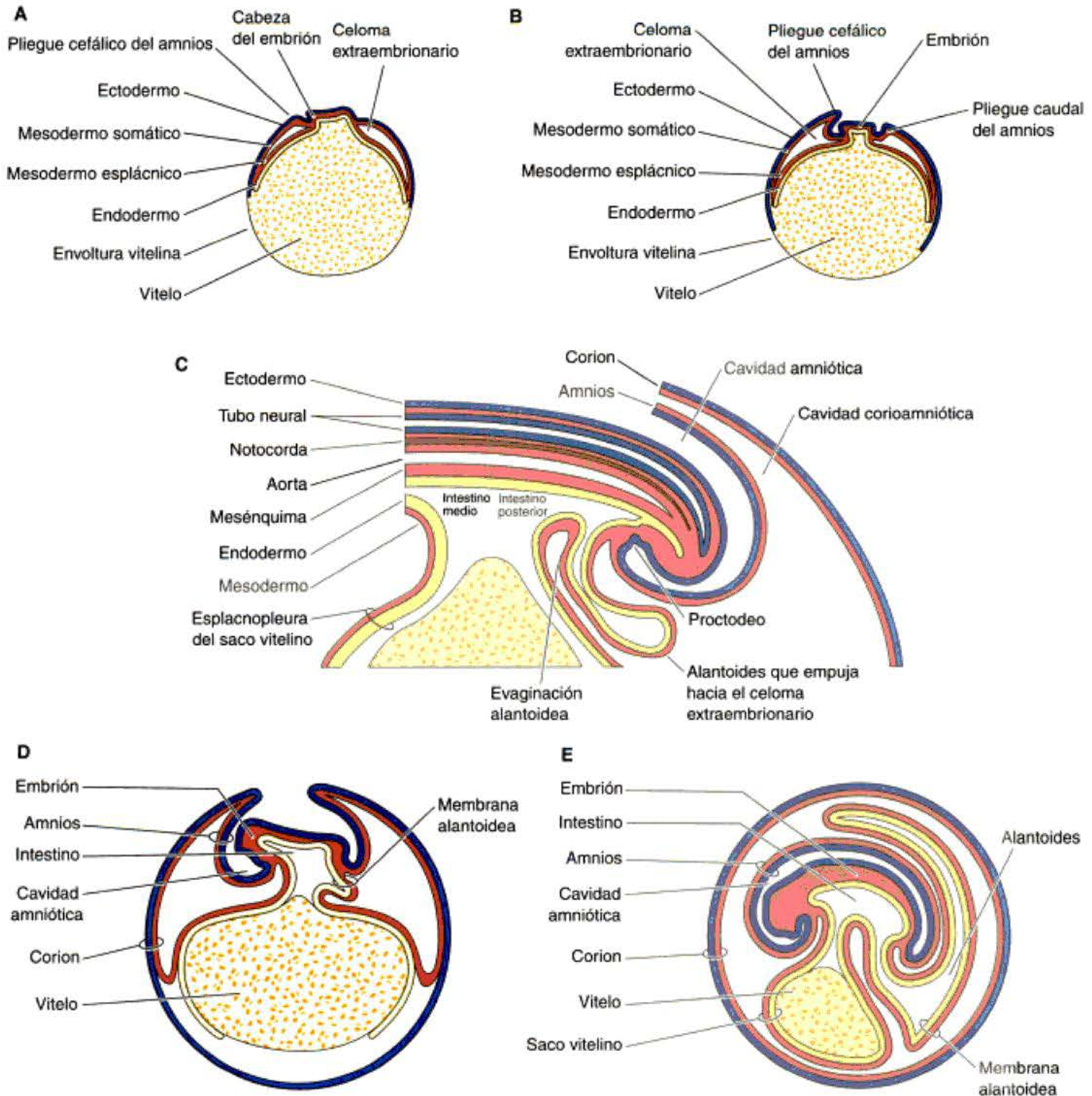


Fig. 15-30. Dibujos esquemáticos de las membranas extraembrionarias del pollo. El embrión está cortado longitudinalmente, y la albúmina y las cubiertas de la cáscara no se muestran. **A.** Embrión de 2 días. **B.** Embrión de 3 días. **C.** Diagrama esquemático detallado de la región caudal (posterior) del embrión de pollo, que muestra la formación del alantoides. **D.** Embrión de 5 días. **E.** Embrión de 9 días. (Según Carlson 1981.)

tos pliegues membranosos se forman por la extensión de epitelio ectodérmico y endodérmico con la lámina lateral del mesodermo subyacente. La combinación de ectodermo y endodermo, con frecuencia referida como la somatopleura (véase fig. 15-3A), forma el amnios y el corion; la combinación de endodermo y mesodermo –la esplacnopleura– forma el saco vitelino y el alantoides. El tejido endodérmico y ectodérmico suministra células epiteliales en funcionamiento y el mesodermo genera el aporte esencial de sangre hacia y desde el epitelio. La formación de estos pliegues puede ser seguida en la figura. 15-30.

El amnios y el corion

El primer problema de las paredes de un huevo que se deposita en la tierra es la desecación. Las células embrionarias deberían secarse rápidamente si ellas no estuviesen en un ambiente acuoso. Este ambiente es proporcionado por el **amnios**. Las células de esta membrana secretan **líquido amniótico**; por lo tanto, la embriogénesis todavía se produce en el agua. Esta adaptación evolutiva es tan significativa y característica que los reptiles, aves y ma-

míferos son agrupados como vertebrados amniotas o **amniotas**.

El segundo problema de un huevo terrestre es el intercambio gaseoso. Este intercambio es proporcionado por el **corion**, la membrana extraembrionaria más externa. En aves y reptiles, esta membrana se adhiere a la cáscara, permitiendo el intercambio de gases entre el huevo y el ambiente. En mamíferos, como se ha visto, el corion se ha desarrollado hacia una **placenta**, que ha evolucionado funciones endocrinas, inmunológicas y nutritivas además de las respiratorias.

La alantoides y el saco vitelino

El tercer problema para un huevo terrestre es la eliminación de los desechos. La **alantoides** almacena los desechos urinarios y también ayuda a mediar el intercambio de gases. En reptiles y aves, la alantoides se convierte en un saco de gran tamaño, debido a que no hay otro modo de mantener a los productos tóxicos del metabolismo alejados del embrión en desarrollo. En algunas especies de amniotas, como los pollos, la capa mesodérmica de la membrana alantoidea alcanza y se fusiona con la capa mesodérmica del corion para crear la **membrana corioalantoidea**. Esta envoltura extremadamente vascularizada es crucial para el desarrollo del pollo y es responsable del transporte de calcio desde la cáscara del huevo hacia el embrión para la producción de hueso (Tuan 1987). En mamíferos, el tamaño de la alantoides depende de cómo los desechos de nitrógeno pueden ser eliminados por la placenta coriónica. En humanos (en los que los desechos nitrogenados pueden ser eliminados eficientemente a través de la circulación materna), la alantoides es un saco vestigial. En cerdos, sin embargo, la alantoides es un órgano importante y de gran tamaño.

Y finalmente, los huevos depositados en la tierra deben resolver el problema de la nutrición. El **saco vitelino** es la primera membrana extraembrionaria en ser formada, debido a que ésta media la nutrición en las aves y reptiles en desarrollo. Éste es derivado de células esplacnopleurales que crecen sobre el vitelo para rodearlo. El saco vitelino está conectado al intestino medio por un tubo abierto, el **conducto vitelino**, de modo tal que las paredes del saco vitelino y las paredes del intestino son continuas. Los vasos sanguíneos dentro del mesodermo de la esplacnopleura transportan nutrientes desde el vitelo hacia el cuerpo, pero el vitelo no es tomado directamente hacia el cuerpo a través del conducto vitelino. En su lugar, las células endodérmicas digieren la proteína en el vitelo hacia aminoácidos solubles que luego pueden pasar hacia los vasos sanguíneos de la pared del saco vitelino. Otros nutrientes, incluidas las vitaminas, iones y ácidos grasos, son almacenados en el saco vitelino y transportados por los vasos sanguíneos del saco vitelino hacia la circulación embrionaria. En este sentido, las cuatro membranas extraembrionarias le permiten al embrión amniota desarrollarse sobre la tierra.

Resumen: lámina del mesodermo lateral y endodermo

1. La lámina del mesodermo lateral se separa en dos capas. La capa dorsal es el mesodermo somático (parietal), que subyace al ectodermo y forma la somatopleura. La capa ventral es el mesodermo esplácnico (visceral), que recubre al endodermo y forma la esplacnopleura.
2. El espacio entre las dos capas de la lámina del mesodermo lateral forma la cavidad corporal o celoma.
3. El corazón se origina desde el mesodermo esplácnico a ambos lados del cuerpo. Esta región de células es denominada el mesodermo cardiogénico. El mesodermo cardiogénico es especificado por las BMP ante la ausencia de las señales de Wnt.
4. Los factores de transcripción Nkx2-5 y GATA son importantes en comprometer al mesodermo cardiogénico para llegar a ser células cardíacas. Estas células precursoras cardíacas migran desde ambos lados de la línea media del embrión, en la región del cuello.
5. El mesodermo cardiogénico forma el endocardio (que es continuo con los vasos sanguíneos) y el miocardio (el componente muscular del corazón).
6. Los tubos endocárdicos se forman separadamente y luego se fusionan. La formación del asa cardíaca del corazón transforma la polaridad anteroposterior original del tubo cardíaco en una polaridad derecha-izquierda.
7. En mamíferos, la circulación fetal difiere drásticamente de la circulación del adulto. Cuando el recién nacido lleva a cabo su primera respiración, los cambios en la presión del aire cierran el agujero oval a través del cual la sangre pasaba desde la aurícula derecha hacia la izquierda. Al mismo tiempo, los pulmones, en lugar de la placenta, se convierten en la fuente de oxígeno.
8. La formación de los vasos sanguíneos es restringida por parámetros fisiológicos, evolutivos y físicos. Las subdivisiones de un vaso de mayor tamaño hacia numerosos de menor tamaño permite el transporte rápido de sangre hacia las regiones de difusión de gas y nutrientes.
9. Los vasos sanguíneos son construidos mediante dos procesos, vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis involucra la condensación de las células del mesodermo esplácnico para formar islotes sanguíneos. Las células externas de estos islotes se convierten en células endoteliales (vasos sanguíneos). La angiogénesis involucra la remodelación de vasos sanguíneos existentes.
10. Numerosos factores paracrinos son esenciales en la formación de vasos sanguíneos. FGF2 es necesario para la especificación de los angioblastos. VEGF es esencial para la diferenciación de los angioblastos. Las angiopoyetinas le permiten a las células de músculo liso (y pericitos tipo músculo liso) rodear a los vasos. Los ligandos efrinas y sus receptores Eph tirosinacinasa son críticos para la formación de los lechos capilares.

11. La célula madre hematopoyética pluripotencial genera otras células madre pluripotenciales, así como las células madre de linaje restringido. Éstas dan origen a todas las células sanguíneas.
12. En mamíferos, las células madre sanguíneas embrionarias son proporcionadas por islotes sanguíneos cerca del vitelo. Las células madre sanguíneas definitivas del adulto vienen de la región aorta-gónada-mesonefros dentro del embrión.
13. La CFU-S es una célula madre sanguínea que puede generar células madre más comprometidas para los diferentes linajes sanguíneos. Los microambientes inductivos hematopoyéticos determinan la diferenciación celular sanguínea.
14. El endodermo construye el tubo digestivo y el tubo respiratorio.
15. Cuatro pares de bolsas faríngeas se convierten en el revestimiento endodérmico de las trompas de Eustaquio, las amígdalas, el timo y de las glándulas paratiroides. La glándula tiroides también se forma en esta región del endodermo.
16. El tejido digestivo se forma mediante interacciones recíprocas del endodermo y el mesodermo. Sonic hedgehog del endodermo parece jugar un papel en la inducción de un patrón de expresión anidado de genes Hox en el mesodermo que rodea al intestino. El mesodermo regionalizado luego instruye al tubo endodérmico para convertirse en los diferentes órganos del tracto digestivo.
17. El endodermo ayuda a especificar el mesodermo esplácnico; el mesodermo esplácnico, especialmente el corazón y los vasos sanguíneos, ayudan a especificar el endodermo.
18. El páncreas se forma en una región de endodermo que carece de la expresión de Sonic hedgehog. El factor de transcripción Pdx1 es expresado en esta región.
19. Las células endocrinas y exocrinas del páncreas tienen un origen común. El factor de transcripción NGN3 probablemente decide el destino endocrino.
20. El tubo respiratorio se forma desde una evaginación del tubo digestivo. La especificidad regional del mesénquima que éste encuentra determina si el tubo se mantiene recto (como en la tráquea) o si se ramifica (como en los alvéolos).
21. El corion y el amnios son producidos por la somatopleura. En aves y reptiles, el corion limita con la cáscara y permite el intercambio de gases. El amnios en aves, reptiles y mamíferos baña al embrión en líquido amniótico.
22. El saco vitelino y la alantoides son derivados de la esplacnopleura. El saco vitelino (en aves y reptiles) le permite a los nutrientes de vitelo pasar hacia la sangre. El alantoides recoge los desechos nitrogenados.

Bibliografía citada

Ahlgren, U., J. Jonnson and H. Edlund. 1996. Alsan The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme in uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF/PDX1-deficient mice. Development 122: 1409-1416.

Alsan, B. H. and T. M. Schultheiss. 2002. Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. Development 129: 1935-1943.

Andrée, B., D. Duprez, B. Vorbusch, H.-H. Arnold and T. Brand. 1998. BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. Mech. Dev. 70: 119-131.

Antczak, A. M., J. van Blerkom and A. Clark. 1997. A novel mechanism of VEGF, leptin, and TGFâ2 sequestration in human ovarian follicle cells. Hum. Reprod. 12: 2226-2234.

Antonchuk, J., G. Savageau and R. K. Humphries. 2002. HoxB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. Cell 109: 39-45.

Apelqvist, A., U. Ahlgren and H. Edlund. 1997. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. Curr. Biol. 7: 801-804.

Auerbach, R., L. Alby, L. Morrissey, M. Tu and J. Joseph. 1985. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. Microvasc. Res. 29: 401-411.

Azar,Y. and H. Eyal-Giladi. 1979. Marginal zone cells–the primitive streak-inducing component of the primary hypoblast in the chick. J. Embryol. Exp. Morphol. 52: 79-88.

Bao, Z.-Z., B. G. Bruneau, I. G. Seidman, C. E. Seidman and C. L. Cepko. 1999. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. Science 283: 1161-1164.

Baron, M. H. 2001. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem-/precursor cells by hedgehog-mediated signals. Differentiation 68: 175-185.

Berardi, A. C., A. Wang, J. D. Levine, P. Lopez and D. T. Scadden. 1995. Functional characterization of human hematopoietic stem cells. Science 267: 104-108.

Bergers, G., K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman and D. Hanahan. 1999. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science 284: 808-812.

Biben, C. and R. P. Harvey.1997. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left-right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. Genes Dev. 11: 1357-1369.

Bruneau, B. G., M. Logan, N. Davis, T. Levi, C. J. Tabin, J. G. Seidman and C. E. Seidman. 1999. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defectsin Holt-Oram syndrome. Dev. Biol. 211: 100-108.

Cao, Y. and R. Cao. 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature 398: 381.

Carlson, B. M. 1981. Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Choi, H., M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Padaimitriou and G. Keller. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development 125: 725-732.

Cohen-Gould, L. and T. Mikawa. 1996. The fate diversity of mesodermal cells

within the heart field during chicken early embryogenesis. Dev. Biol. 177: 265-273.

Colas, J. F., A. Lawson and G. C. Schoenwolf 2000. Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the bilateral heart-forming regions. Dev. Dynam. 218: 316-330.

Corder, R., J. A. Douthwaite, D. M. Lees, N. Q. Khan, A. C. Viseu Dos Santos, E. G. Wood and M. J. Carrier. 2001. Endothelin-l synthesis reduced by red wine. Nature 414: 863-864.

Cormier, F. and F. Dieterlen-Lievre. 1988. The wall of the chick aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. Development 102: 279-285.

Crelin, E. S. 1961. Development of the gastrointestinal tract. Clin. Symp. 13: 68-82.

Davis, S. and 10 others. 1996. Isolation of angiopoietin-l, a ligand for the TIE2 receptor, by
secretion trap expression cloning. Cell 87: 1161-1169.

DeHaan, R. L. 1959. Cardia bifida and the development of pacemaker function in the early
chicken heart. Dev. Biol. 1: 586-602.

DeHaan, R. L. 1967. Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. Dev. Biol. 16: 216-249.

Dieterlen-Lievre, F. and C. Martin.1981. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev. Biol. 88: 180-191.

Ergun, S. and 14 others. 2001. Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. Angiogenesis 4: 193-206

Ferrara, N. and K. Alitalo. 1999. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nature Med. 5: 1359-1364.

Ferrara, N. and 8 others. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380: 439-442.

Fidler, I. J. and L. M. Ellis. 1994. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 70: 185-188.

Fishman, M. P. and D. A. Melton. 2002. Pancreatic lineage analysis using a retroviral vector in embryonic mice demonstrates a common progenitor for endocrine and exocrine cells. Int. J. Dev. Biol. 46: 201-207.

Flamme, I. and W. Risau. 1992. Induction of vasculogenesis and hematogenesis in vitro. Development 116: 435-439.

Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy and G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. Jl. Exp. Med. 133: 275-288.

Fong, G.-H., J. Rossant, M. Gertenstein and M. L. Breitman. 1995. Role of the Flt-l receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376: 66-70.

Fukumachi, H. and S. Takayama. 1980. Epithelial-mesenchymal interaction in differentiation of duodenal epithelium of fetal rats in organ culture. Experientia 36: 335-336.

Gannon, M. and C. Wright. 1999. Endodermal patterning and organogenesis. In S. A. Moody (ed.), Cell Lineage and Fate Determination. Academic Press, San Diego. pp. 583-615.

Godde, R. and H. Kurz. 2001. Structural and biophysical simulation of angiogenesis and vascular remodeling. Dev. Dynam. 220: 387-401.

Godlin, I. E., I. A. Garcia-Porrero, A. Coutinho, F. Dieterlen-Lievre and M. A. R. Marcos. 1993. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contain Bla cell progenitors. Nature 364: 67-70.

Gordon, M. Y., G. P. Riley, S. M. Watt and M. F. Greaves. 1987. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. Nature 326: 403-405.

Graper, L.1907. Untersuchungen uber die Herz-bildung der Vogel. Wilhelm RouxArch. Entwicklungsmech. Org. 24: 375-410.

Grapin-Botton, A., A. R. Majithia and D. A. Melton. 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. Genes Dev. 15: 444-454.

Gu, G., J. Dubauskaite and D. A. Melton. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3$^+$ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development 129: 2447-2457.

Gualdi, R., P. Bossard, M. Zheng, Y. Hamada, J. R. Coleman and K. S. Zaret. 1996. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: Cell signaling and transcriptional control. Genes Dev. 10: 1670-1682.

Gumpel-Pinot, M., S. Yasugi and T. Mizuno. 1978. Différenciation d'épithéliums endodermiques associaés au mésoderme splanchnique. Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris) 286: 117-120.

Hanahan, D. 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science 277: 48-50.

Hanai, J.-I. and 8 others. 2002. Endostatin causes G_1 arrest of endothelial cells through inhibi- tion of cyclin Dl. J. Biol. Chem. 277: 16464-16469.

Harary, I. and B. Farley.1963. In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. Exp. Cell Res. 29: 466-474.

Harvey, W. 1651. Exercitationes de Generatione Animalium. Jansson, Amsterdam. Quoted in J. Needham, A History of Embryology. Abelard-Schuman, New York. pp. 133-153.

Hay, E. 1966. Regeneration. Holt, Rinehart & Winston, New York.

Hebrok, M., S. Kim and D. A. Melton. 1998. Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development. Genes Dev. 12: 1705-1713.

Heissig, B. and 11 others. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kitligand. Cell 109: 625-637.

Hemmati-Brivanlou, A. and G. H. Thomsen. 1995. Ventral mesodermal patterning in Xenopus embryos: Expression patterns and activities of BMP2 and BMP4. Dev. Genet. 17: 78-89.

Horb, M. E. and J. M. Slack. 2001. Endoderm specification and differentiation in Xenopus embryos. Dev. Biol. 236: 330-343.

Hunt, P., D. Robertson, D. Weiss, D. Rennick, F. Lee and O. N. Witte. 1987. A single bone marrow stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. Cell 48: 997-1007.

Imanaka-Yoshida, K., K. A. Knudsen and K. K. Linask. 1998. N-cadherin is required for the differentiation and initial myofibrillogenesis of chick cardiomyocytes. Cell Motil. Cytoskeleton 39: 52-62.

Ishii, Y., K. Fukuda, H. Saiga, S. Matsushita and S. Yasugi. 1997. Early specifica-

quired for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. EMBO J. 15: 4123-4129.

Roberts, D. J., R. L. Johnson, A. C. Burke, C. E. Nelson, B. A. Morgan and C. Tabin. 1995. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. Development 121: 3163-3174.

Roberts, D. J., D. M. Smith, D. I. Goff and C. J. Tabin. 1998. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. Development 125: 2791-2801.

Roberts, R., J. Gallagher, E. Spooncer, T. D. Allen, F. Bloomfield and T. M. Dexter. 1988. Heparan sulphate-bound growth factors: A mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. Nature 332: 376-378.

Rodaway, A. and R. Patient. 2001. Mesendoderm: An ancient germ layer? Cell 105: 169-172.

Rottbauer, W., K. Baker, Z. G. Wo, M. A. Mohideen, H. F. Cantiello and M. C. Fishman. 2001. Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel α1 subunit. Dev. Cell 1: 265-275.

Rugh, R. 1951. The Frog Its Reproduction and Development. Blakiston, Philadelphia.

Sakiyama, J.-I., A. Yamagishi and A. Kuroiwa. 2003. Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. Development 130: 1225-1234.

Schneider, V. A. and M. Mercola. 2001. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis. Genes Dev. 15: 304-315.

Schott, J.-J. and 8 others. 1998. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. Science 281: 108-111.

Schultheiss, T. M., S. Xydas and A. B. Lassar. 1995. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development 121: 4203-4214.

Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertenstein, X.-F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. Nature 376: 62-66

Shalaby, F. and 7 others. 1997. A requirement for Flkl in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell 89: 981-990.

Shannon, J. M., L. D. Nielsen, S. A. Gebb and S. H. Randell. 1998. Mesenchyme specifies epithelial differentiation in reciprocal recombinants of embryonic lung and trachea. Dev. Dynam. 212: 482-494.

Sierra-HonigmanD, M. R. and 10 others. 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. Science 281: 1683-1686.

Spinella, F., L. Rosano, V. DiCastro, P. G. Natali and A. Bagnato. 2002. Endothelin-l induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factorloc in ovarian carcinoma cells. J. Biol. Chem. 277: 27850-27855.

Srivastava, D. and E. N. Olson. 2000. A genetic blueprint for cardiac development. Nature 407: 221-232.

Srivastava, D., P. Cserjesi and E. N. Olson. 1995. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. Science 270: 1995-1999.

Sugi, Y. and J. Lough. 1994. Anterior endoderm is a specific effector of terminal cardiac myocyte differentiation of cells from the embryonic heart forming region. Dev. Dynam. 200: 155-162.

Suri, C. and 7 others. 1996. Requisite role of angiopoietin-l, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87: 1171-1180.

Tsuda, T., N. Philp, M. H. Zile and K. K. Linask. 1996. Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. Dev. Biol. 173: 39-50.

Tuan, R. 1987. Mechanisms and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. J. Exp. Zool. [Suppl.] 1: 1-13.

Tzahor, E. and A. B. Lassar. 2001. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. Genes Dev. 15: 255-260.

Vikkula, M. and 11 others. 1996. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. Cell 87: 1181-1190.

Vokes, S. A. and P. A. Krieg. 2002. Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. Development 129: 775-785.

Wakimoto, K. and 19 others. 2000. Targeted disruption of Na^{+}/Ca^{2+} exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heart-beat. J. Biol. Chem. 275: 36991-36998.

Wallace, K. N. and M. Pack. 2003. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. Dev. Biol. 255: 12-29.

Wang, D.-Z. and 8 others. 1999. Requirement of a novel gene, Xin, in cardiac morphogenesis. Development 126: 1281-1294.

Wang, H. U., Z.-F. Chen and D. J. Anderson. 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. Cell 93: 741-753.

Warren, L. 1998. Joseph Leidy: The Last Man Vlho Knew Everything. Yale University Press New Haven.

Weinstein, B. M. and N. D. Lawson. 2003. Arteries, veins, Notch, and VEGF. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 67. In press.

Wessells, N. K. 1970. Mammalian lung development: Interactions in formulation and morphogenesis of tracheal buds. J. Exp. Zool. 175: 455-466.

Whitlock, C. A., G. F. Tidmarsh, C. Muller-Sieburg and I. L. Weissman. 1987. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. Cell 48: 1009-1021.

Wilt, F. H. 1974. The beginnings of erythropoiesis in the yolk sac of the chick embryo. Ann. NY Acad. Sci. 241: 99-112.

Wolf, N. S. and J. J. Trentin. 1968. Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J. Exp. Med. 127: 205-214.

Wood, H. B., G. May, L. Healy, T. Enver and G. M. Morriss-Kay. 1997. CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. Blood 90: 2300-2311.

Wu, P. and 7 others. 2001. Hypoxia downregulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 288: 1149-1154.

Xavier-Neto, J. and 7 others. 1999. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. Development 126: 2667-2687.

Capítulo 16 Desarrollo de la extremidad en los tetrápodos

Mis brazos son más largos que mis piernas... Soy mi propio escultor: me formo desde dentro con materiales vivientes, húmedos, maleables: ¿qué otro artista ha tenido alguna vez disponible para él un diseño tan perfecto como el que poseen mis martillos y cinceles?: las células se mueven hasta el punto exacto para construir un brazo: ésta es la primera vez que lo han hecho alguna vez, nunca antes y nunca después, ¿ustedes entienden lo que digo? Nunca me repetirán.

CARLOS FUENTES (1989)

¿Qué puede ser más curioso que la mano de un hombre formada para agarrar, la de un topo para cavar, la pata de un caballo, la pala de la marsopa y el ala de un murciélago? ¿Deberían todas ser construidas sobre el mismo patrón y deberían incluir huesos similares y las mismas posiciones relativas?

CHARLES DARWIN (1859)

CONSIDERE SU EXTREMIDAD. En primer lugar, considere su polaridad. Éstas tienen dedos de la mano o del pie en un extremo, un húmero o fémur en el otro. En ningún caso, entre usted o sus amigos encontrará alguno con dedos de la mano en la mitad de su mano. Considere también las diferencias entre sus manos y sus pies. Las diferencias son sutiles, difíciles de poner en palabras, pero muy obvias. Si sus dedos de la mano fueran reemplazados por dedos del pie, usted lo sabría. Pero entonces considere cuán *similares* son los huesos de sus pies a los huesos de sus manos; fácilmente verá que ellos comparten un patrón común. Los huesos de cualquier extremidad de vertebrado, sean éstos brazos o patas, alas o aletas, consisten en un **estilópodo** proximal (húmero/fémur) adyacente a la pared corporal; un **zeugópodo** (radio-cúbito/tibia-peroné) en la región media; y un **autópodo** distal (carpo-dedos de la mano/tarso-dedos del pie) (fig. 16-1). Por último, considere el crecimiento de sus extremidades. Cada uno de sus pies es muy similar en tamaño a su otro pie. Cada una de sus manos es destacablemente similar en tamaño a su otra mano. Tanto como después de 20 años de crecimiento, cada uno de sus pies resulta ser, independientemente, de la misma longitud.

Estos fenómenos comunes constituyen preguntas fascinantes para los biólogos del desarrollo. ¿Cómo puede el crecimiento ser regulado de manera tan sorprendente? ¿Cómo es que tenemos cuatro extremidades y no seis u ocho? ¿Cómo es que los dedos de la mano se forman en la punta de una extremidad y en ningún otro lado más? ¿Cómo es que el dedo meñique se desarrolla en un borde de la extremidad y el dedo pulgar en el otro? ¿Cómo hace para crecer la extremidad anterior de modo diferente a la extremidad posterior?

Todas estas preguntas son en realidad acerca de la formación de patrón. La **formación de patrón** es un grupo de procesos por los cuales las células embrionarias forman disposiciones ordenadas de manera espacial de tejidos diferenciados. La capacidad para llevar a cabo el proceso de formación de patrón es una de las propiedades más espectaculares de los organismos en desarrollo y una de las que ha provocado un sentido de respeto tanto en los científicos como en el lego. Una cosa es diferenciar condrocitos y osteocitos que sintetizan las matrices cartilaginosa y ósea, respectivamente; otra cosa es producir aquellas células en una orientación temporal-espacial que genere un hueso funcional. Aún más es otra cosa producir con este hueso un húmero y no una pelvis o un fémur. La capacidad de las células de la extremidad para detectar sus posiciones relativas y diferenciarse con respecto a aquellas posiciones ha sido sujeto de intenso debate y experimentación.

La extremidad de los vertebrados es un órgano extremadamente complejo con una organización asimétrica de las partes en las tres dimensiones. La primera dimensión es el **eje proximal** (cerca)-**distal** (lejos). Los huesos de la extremidad se forman por osificación endocondral. Ellos son inicialmente cartilaginosos, pero finalmente, la mayoría de su cartílago es reemplazado por hueso. De algún modo las células de la extremidad se desarrollan de modo diferente en los estadios tempranos del desarrollo (cuando ellas producen el estilópodo) que en los estadios posteriores (cuando producen el autópodo).

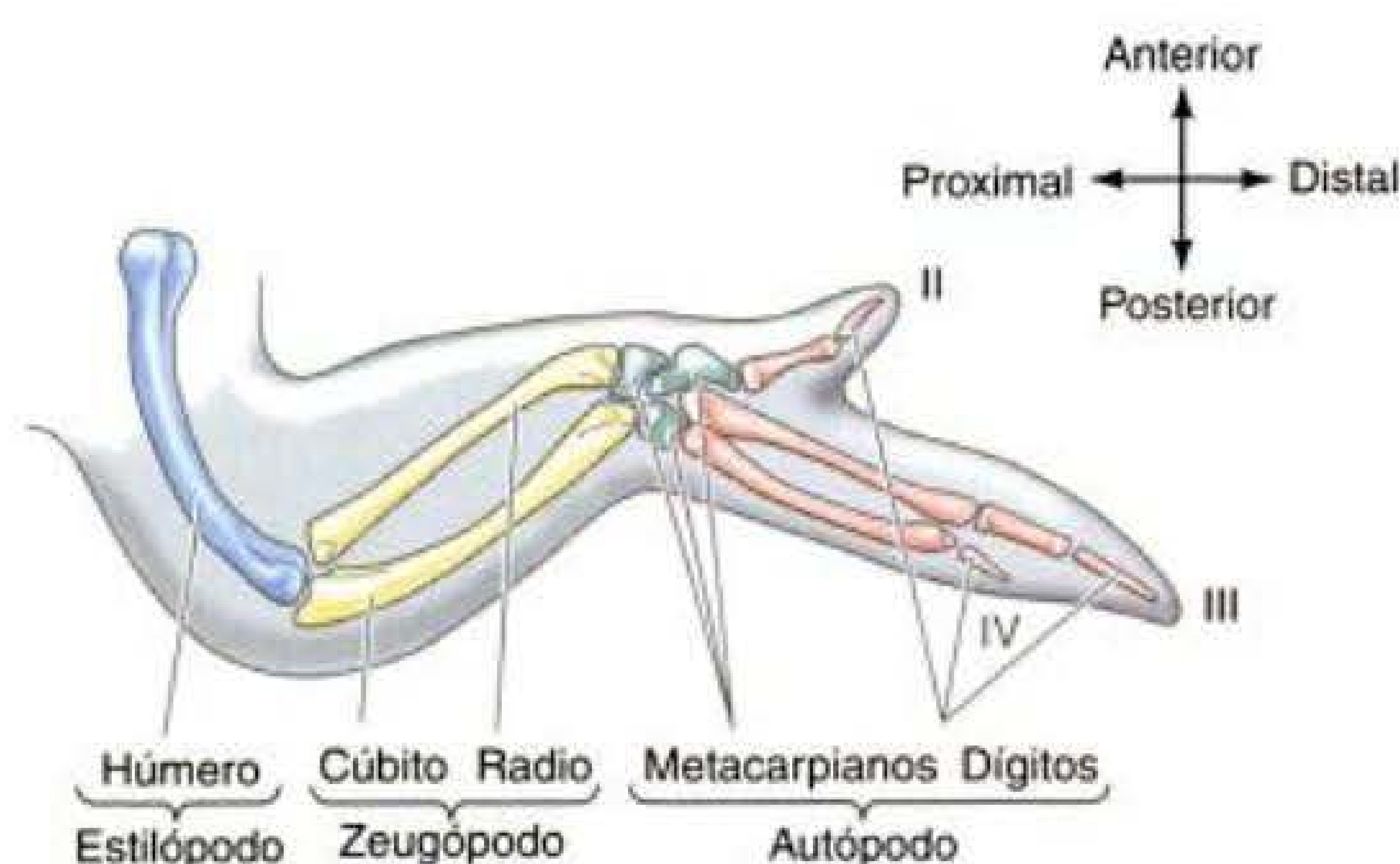


Fig. 16-1. Patrón esquelético del ala del pollo. De acuerdo a convenciones, los dígitos son numerados II, III y IV. (Los dígitos I y V no se encuentran en el ala del pollo.)

El segundo eje es el **eje anteroposterior**. Nuestro dedo meñique, por ejemplo, marca el lado *posterior*, mientras que nuestro dedo pulgar está en el lado *anterior*. En humanos, resulta obvio que cada mano se desarrolla como una imagen en espejo de la otra. Uno podría imaginarse que existan otras disposiciones –tales como el pulgar desarrollándose sobre el lado izquierdo de ambas manos– pero estos patrones no se producen. El tercer eje, el eje **dorsoventral**. La palma (ventral) es fácilmente distinguible de los nudillos (dorsal). De alguna forma, el complejo patrón tridimensional de la extremidad anterior es producido rutinariamente.

El problema fundamental de la morfogénesis –cómo estructuras específicas se originan en sitios particulares– es ejemplificado en el desarrollo de la extremidad. Además, debido a que las extremidades, a diferencia del corazón o del cerebro, nos son esenciales para la vida embrionaria o fetal, se pueden extirpar experimentalmente partes de la extremidad en desarrollo, o crear mutantes específicos de la extremidad sin interferir con los procesos vitales del organismo. Tales experimentos han demostrado que las "reglas morfogenéticas" básicas para la formación de una extremidad parecen ser las mismas en todos los tetrápodos. Porciones injertadas de esbozos de extremidad de reptil o de mamífero pueden dirigir la formación de las extremidades del pollo y regiones de esbozos de la extremidad de la rana pueden dirigir el establecimiento del patrón de las extremidades de las salamandras (Fallon y Crosby 1977; Sessions y col. 1989; véase Hinchliffe 1991). Además, como se detallará en el capítulo 18, extremidades de salamandra en *regeneración* parecen seguir las mismas reglas a medida que las extremidades se desarrollan (Muneoka y Bryant 1982). Pero ¿cuáles son estas reglas morfogenéticas?

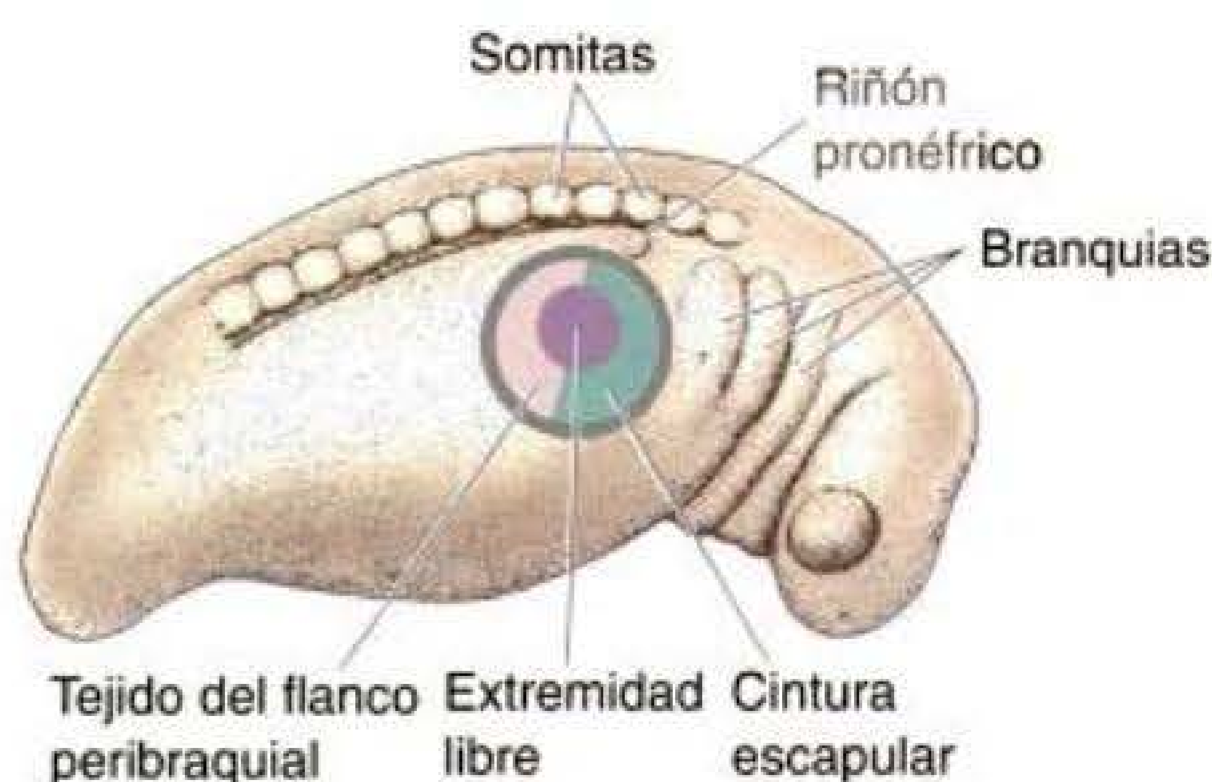


Fig. 16-2. Campo prospectivo de la extremidad anterior de la salamandra *Ambystoma maculatum*. El área central contiene células destinadas a formar la extremidad misma (la extremidad libre). Las células que rodean a la extremidad libre dan origen al tejido del flanco peribraquial y de la cintura escapular. El anillo de células por fuera de estas regiones no es incluido frecuentemente en la extremidad, pero puede formar una extremidad si es extirpado el tejido más central. (Según Stocum y Fallon 1983.)

La información posicional necesaria para construir una extremidad tiene que funcionar en un sistema de coordenada tridimensional.* Durante la última década, han sido identificadas proteínas particulares que juegan un papel en la formación de cada uno de estos ejes de la extremidad. El eje proximodistal (hombro-dedo de la mano; cadera-dedo del pie) parece ser regulado por las proteínas de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF). El eje anteroposterior (pulgar-meñique) parece ser regulado por la proteína Sonic hedgehog y el eje dorsoventral (nudillo-palma) es regulado, al menos en parte, por Wnt7a. Las interacciones de estas proteínas se sustentan entre sí y determinan la diferenciación de los tipos celulares.

SITIO WEB 16.1 **El modelado matemático del desarrollo de la extremidad (The mathematical modeling of limb development).** La especificación de los ejes de la extremidad y los patrones en los que la evaginación de la extremidad podrían ocurrir fueron predichos matemáticamente antes de que sean descubiertas las interacciones moleculares reales.

Formación del esbozo de la extremidad

Especificación del campo de la extremidad: genes Hox y ácido retinoico

Las extremidades no se forman en cualquier lugar a lo largo del eje corporal. En su lugar, hay posiciones diferenciadas donde son generadas las extremidades. Las células mesodérmicas que dan origen a la extremidad de los vertebrados pueden ser identificadas cuando 1) al extirpar ciertos grupos de células y observar que una extremidad no se desarrolla en su ausencia (Detwiler 1918; Harrison 1918), 2) al trasplantar grupos de células a una nueva localización y observar que ellas forman una extremidad en este nuevo lugar (Hertwig 1925) y 3) al marcar grupos de células con colorantes o precursores radiactivos y observar que sus descendientes toman parte en el desarrollo de la extremidad (Rosenquist 1971). La figura 16-2 muestra el área prospectiva de la extremidad anterior en el estadio

* En realidad, éste es un sistema de cuatro dimensiones, en el que el tiempo es el cuarto eje. Los biólogos del desarrollo acostumbran a ver la naturaleza en cuatro dimensiones.

de esbozo caudal de la salamandra *Ambystoma maculatum*. El centro del disco normalmente da origen a la extremidad en sí misma. Adyacente a ésta están las células que formarán el tejido del flanco peribraquial y a la cintura escapular. Sin embargo, si son extirpadas todas estas células del embrión, todavía se formará una extremidad, aunque algo más tarde, desde un anillo adicional de células que rodean a esta área (y que normalmente podría formar un miembro). Si este último anillo de células es incluido en el tejido extirpado, no se desarrollará una extremidad. Esta región de mayor tamaño, que representa a todas las células en el área capaz de formar un miembro, es denominada el **campo de la extremidad**.

Cuando se forma, el campo de la extremidad tiene la capacidad para regular la pérdida o el agregado de partes. En el estadio de esbozo caudal del *Ambystoma*, cualquier mitad del disco de la extremidad es capaz de generar una extremidad entera cuando es injertada hacia un nuevo sitio (Harrison 1918). Este potencial también puede ser demostrado mediante la separación del disco de la extremidad verticalmente en dos o más segmentos y la colocación de delgadas barreras entre los segmentos para impedir que se vuelvan a unir. Cuando se hace esto, cada segmento desarrolla una extremidad completa. La capacidad regulativa del esbozo de la extremidad ha sido destacada recientemente mediante un experimento sorprendente de la naturaleza. En numerosas lagunas en los Estados Unidos, se han encontrado ranas y salamandras con múltiples patas (fig. 16-3). La presencia de estos apéndices extra ha sido relacionada a la infestación del abdomen de la larva por gusanos trematodes parásitos. Los huevos de estos gusanos aparentemente separan los esbozos de la extremidad en varios lugares mientras que los renacuajos están formando sus esbozos de las extremidades (Sessions y Ruth 1990; Sessions y col. 1999). Por lo tanto, como en un embrión temprano de erizo de mar, el campo del miembro representa un "sistema equipotencial armonioso" en el que una célula puede ser instruida a formar cualquier parte de la extremidad.

De manera interesante, en todos los vertebrados terrestres, hay solo cuatro esbozos de extremidades por embrión y están siempre opuestos entre sí con respecto a la línea media. Aunque las extremidades de diferentes vertebrados difieren con respecto al nivel del somita en el que ellas se originan, su posición es constante con respecto al nivel de expresión de los genes Hox a lo largo del eje anteroposterior (véase cap. 11). Por ejemplo, en peces (en los que las aletas pélvicas y pectorales corresponden a las extremidades anterior y posterior, respectivamente), en anfibios, aves y mamíferos, los esbozos de las extremidades anteriores son hallados en la región de expresión más anterior de *Hoxc-6*, la posición de la primera vértebra torácica* (Oliver y col. 1988; Molven y col. 1990; Burke y col. 1995). La lámina del mesodermo lateral en el campo de la extremidad es también especial debido a que ésta induce a los mioblastos a migrar hacia fuera desde los somitas e ingresar en el esbozo de la extremidad para llegar a ser la musculatura del miembro. Ninguna otra región de la lámina del mesodermo lateral puede hacerlo (Hayashi y Ozawa 1995).

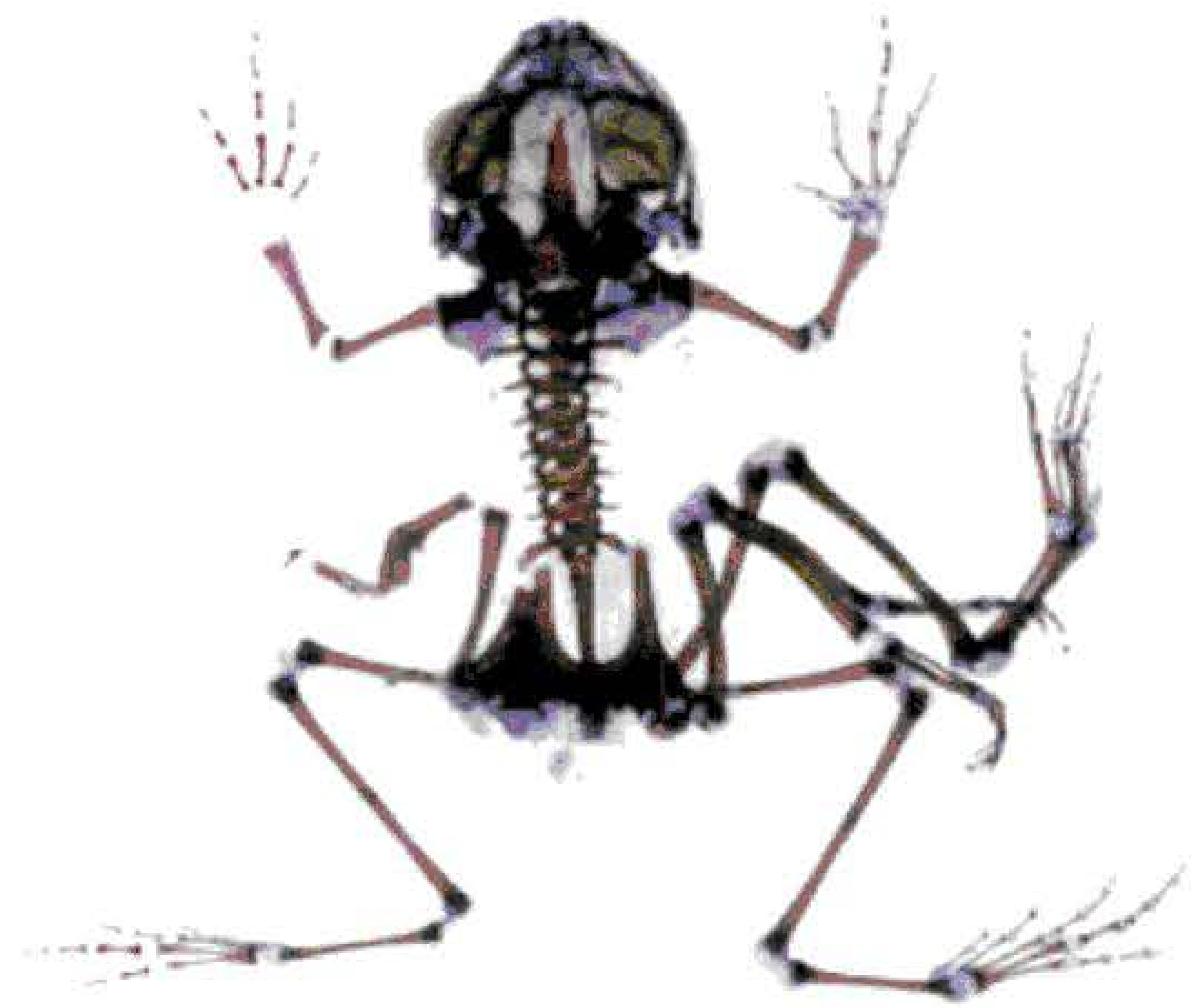


Fig. 16-3. La capacidad regulativa del campo de la extremidad como es demostrada por un experimento en la naturaleza. Esta rana arbórea del pacífico de múltiples extremidades, *Hyla regilla*, es el resultado de la infestación de los esbozos de extremidades en desarrollo de estadio de renacuajo por quistes de trematodos. En este esqueleto de rana adulta, el cartílago está teñido de azul; los huesos están teñidos de rojo. (Fotografía cortesía de S. Sessions.)

El **ácido retinoico** parece ser crítico para el inicio de la evaginación del esbozo de la extremidad, debido a que el bloqueo de la síntesis de ácido retinoico con ciertas drogas evita el inicio del esbozo de la extremidad (Stratford y col. 1996). Bryant y Gardiner (1992) sugirieron que un gradiente de ácido retinoico a lo largo del eje anteroposterior podría activar a ciertos genes homeóticos en células particulares y, de este modo, especificarlas a ser incluidas en el campo de la extremidad. La fuente de este ácido retinoico probablemente sea el nódulo de Hensen (Hogan y col. 1992). La especificación de los campos de las extremidades mediante genes Hox activados por ácido retinoico podría explicar una observación extraña (Mohanty-Hejmadi y col. 1992; Maden 1993): cuando las *colas* de los renacuajos fueron amputadas y los muñones expuestos a ácido retinoico durante los primeros días de regeneración, los renacuajos regeneraban varias *patas* desde el muñón de la cola (fig. 16-4). Parece que el ácido retinoico causó una transformación homeótica en la cola en regeneración mediante la reespecificación del tejido de la cola a medida que la región pélvica formaba la extremidad (Müller y col. 1996).

Inducción del esbozo temprano de la extremidad: las proteínas Wnt y los factores de crecimiento fibroblástico

El desarrollo de la extremidad comienza cuando las células mesenquimáticas proliferan desde la hoja somática del campo de la extremidad de la lámina del mesodermo

* De modo interesante, la expresión de los genes Hox en, al menos, algunas víboras (como Pitón) crean un patrón en el que cada somita es especificado para llegar a ser una vértebra torácica (con costillas). No se ven los patrones de expresión de los genes Hox asociados con las regiones formadoras de extremidades (Cohn y Tickle 1999; véase capítulo 23).

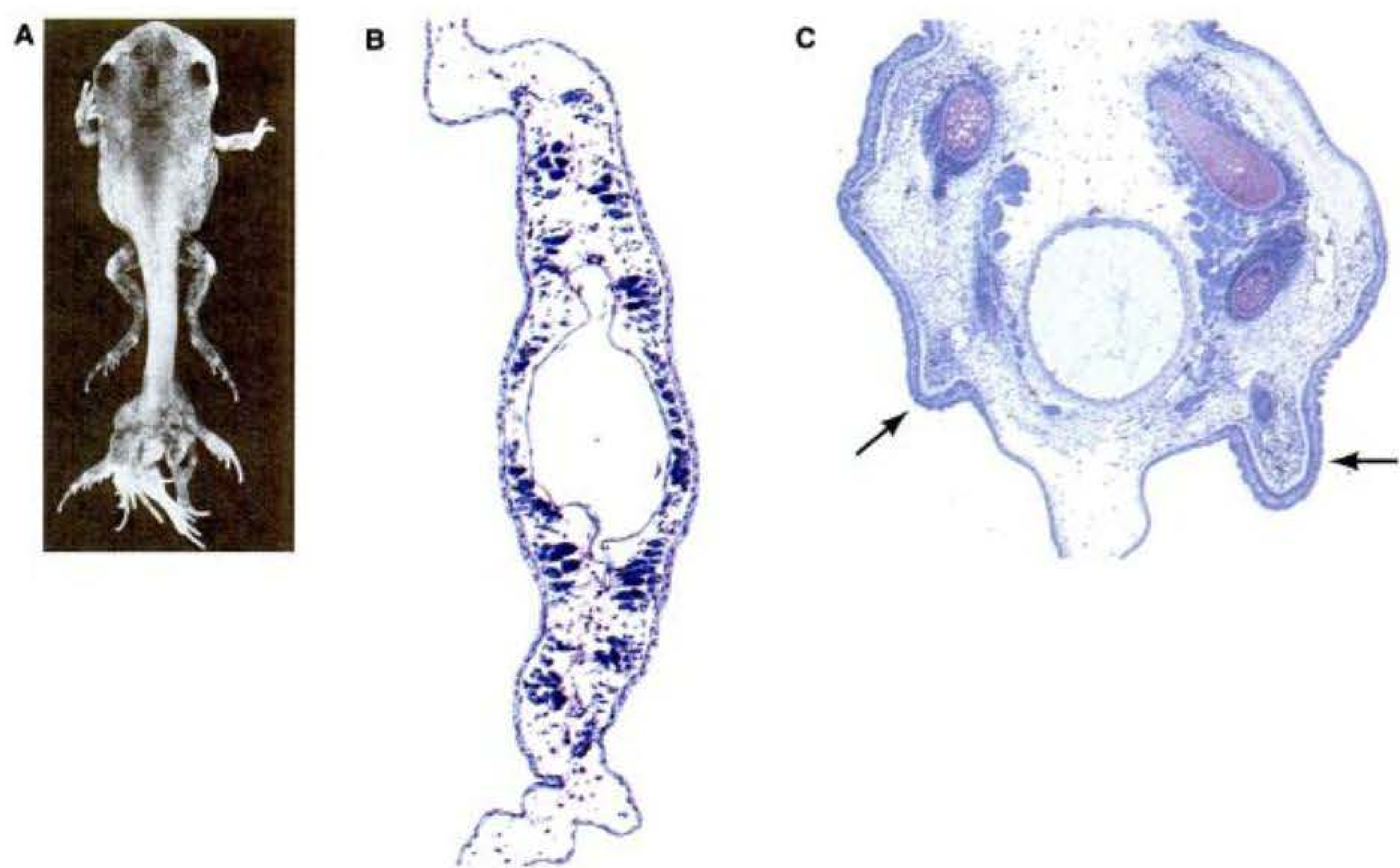


Fig. 16-4. El ácido retinoico provoca la regeneración de extremidades posteriores desde una cola de renacuajo amputada. **A.** El muñón de la cola de un renacuajo de rana globo tratada con ácido retinoico después de la mutación formará extremidades en el sitio de amputación. **B.** Regeneración normal de la cola en un renacuajo de *Rana temporaria* 4 semanas después de la amputación. Se puede ver un pequeño tubo neural por arriba de una notocorda de gran tamaño y que los músculos están organizados en paquetes. No se encuentra cartílago ni hueso. **C.** Una cola de renacuajo tratada con ácido retinoico produce esbozos de extremidades (flechas) así como cartílago y hueso pélvico. Puede verse el rudimento cartilaginoso del fémur en el esbozo de la extremidad derecha. (A, de Mohanty-Hejmadi y col. 1992, cortesía de P. Mohanty-Hejmadi; B y C, de Müller y col. 1996, cortesía de G. Müller.)

lateral (precursores *esqueléticos* de la extremidad) y desde los somitas (precursores del *músculo* de la extremidad; fig. 16-5). Estas células se acumulan bajo el tejido ectodérmico para crear una prominencia circular denominada **esbozo de la extremidad**. Estudios recientes sobre los estadios tempranos de la formación de la extremidad han demostrado que la señal para la formación del esbozo de la extremidad proviene de las células de la lámina del mesodermo lateral que llegarán a ser el mesénquima prospectivo de la extremidad. Estas células secretan el factor paracrino **FGF10**. FGF10 es capaz de iniciar las interacciones formadoras de músculo entre el ecto-

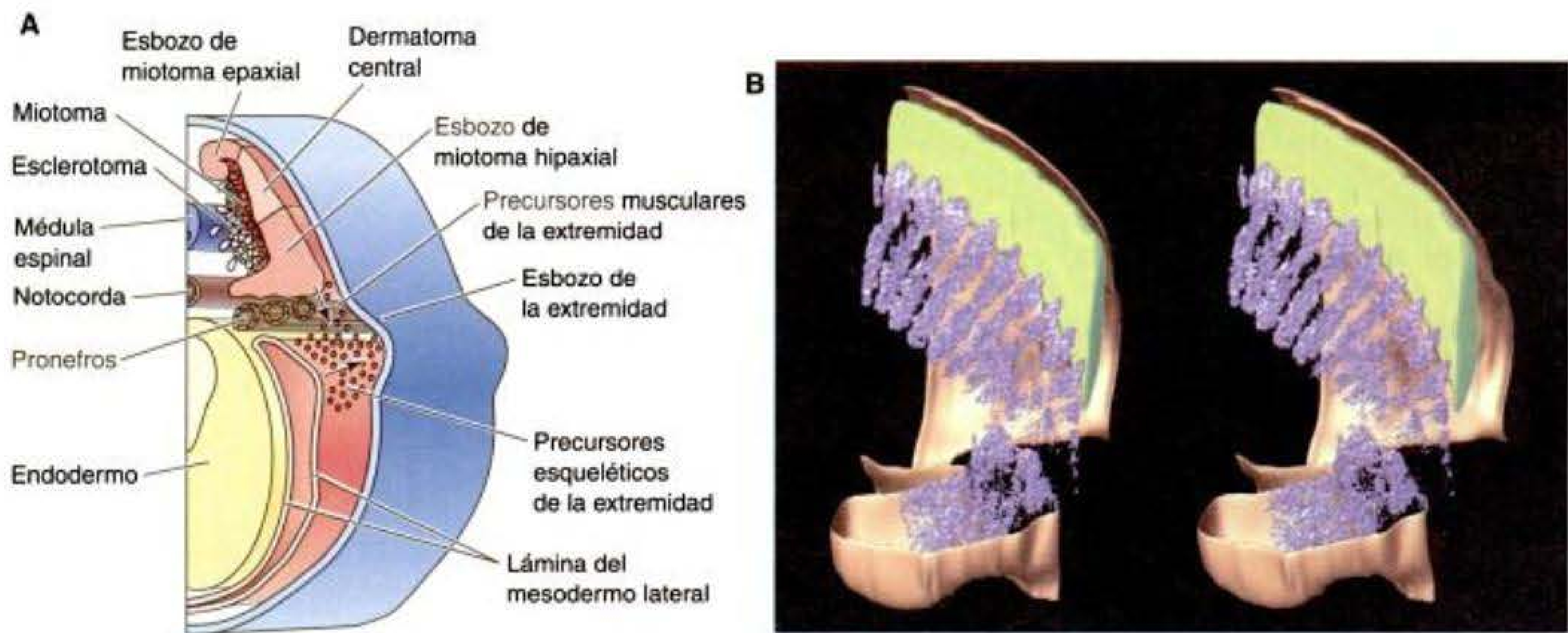


Fig. 16-5. Formación del esbozo de la extremidad. **A.** La proliferación de células mesodérmicas desde la región somática de la lámina del mesodermo lateral lleva al esbozo de la extremidad del embrión de anfibio a sobresalir hacia afuera. Estas células generan los elementos esqueléticos de la extremidad. Las contribuciones de las células desde el miotoma proporcionan la musculatura de la extremidad. **B.** Ingreso de las células del miotoma (violeta) hacia el esbozo de la extremidad. Esta reconstrucción por computadora fue hecha desde secciones de una hibridación in situ para el mRNA de *myf5* encontrado en las células musculares en desarrollo. Si puede cruzar sus ojos (o tratar de enfocar "mas allá" de la página, examinando sus dedos del pie), se hará evidente la tridimensionalidad del estereograma. (B, fotografía cortesía de J. Streicher y G. Müller.)

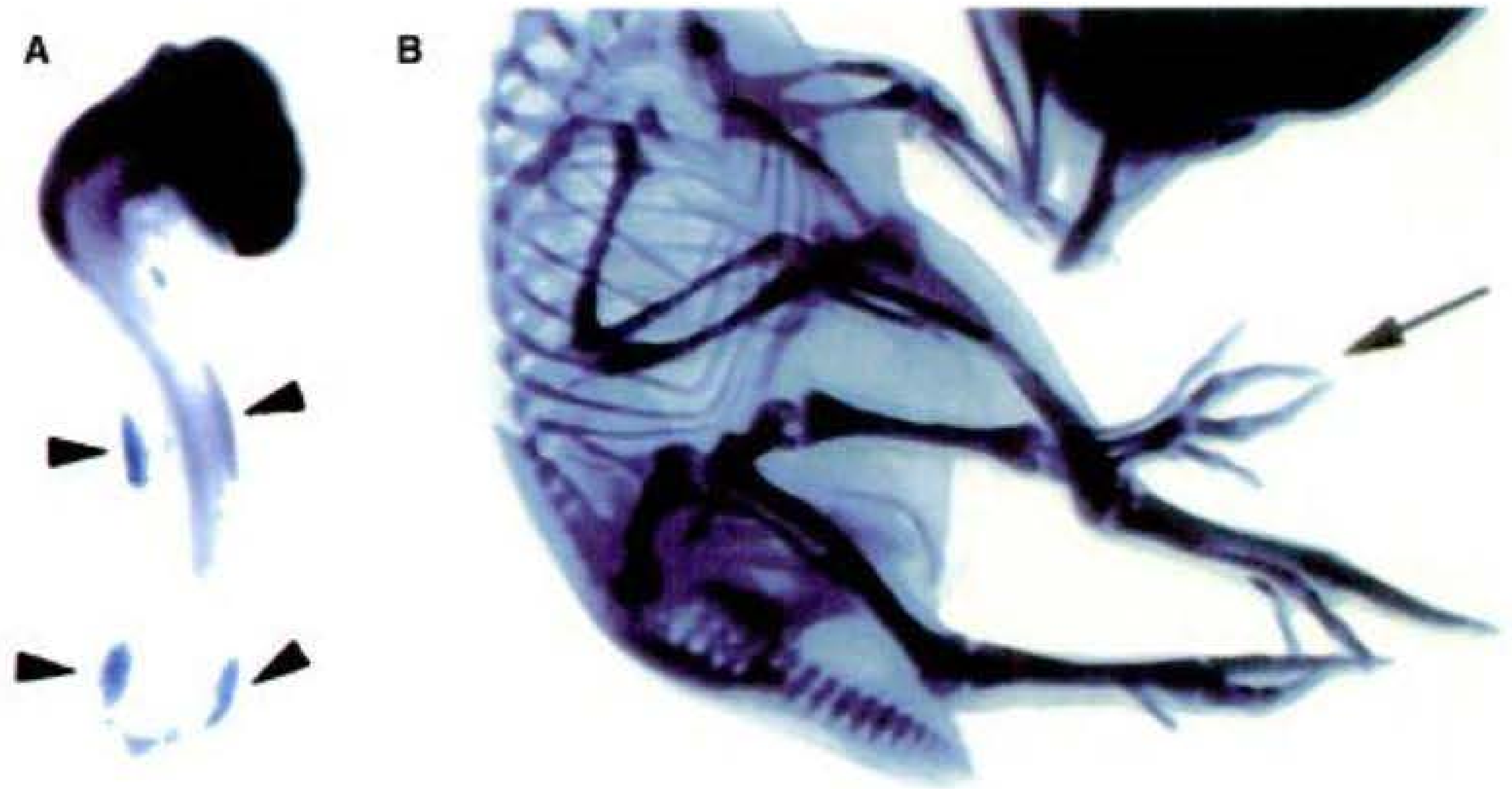


Fig. 16-6. Expresión de FGF10 y acción en el desarrollo de la extremidad del pollo. **A.** FGF10 se expresa en la lámina del mesodermo lateral precisamente en aquellas posiciones (flechas) donde se forman normalmente las extremidades. **B.** Cuando son colocadas células transgénicas que secretan FGF10 en los flancos de un embrión de pollo estas células pueden causar la formación de una extremidad ectópica (flecha). (De Ohuchi y col. 1997; cortesía de S. Noji.)

dermo y el mesodermo. Si se colocan ectópicamente bolitas que contienen FGF10 por debajo del flanco del ectodermo, surgen extremidades extra (fig. 16-6) (Ohuchi y col. 1997; Sekine y col. 1999). FGF10 es producido originalmente en toda la lámina del mesodermo lateral, pero inmediatamente previo a la formación de la extremidad, éste llega a ser restringido a las regiones de la lámina del mesodermo lateral donde se formarán las extremidades. Esta restricción en la localización parece deberse a las acciones de las proteínas Wnt (Wnt2b en la región de la extremidad anterior del pollo; Wnt8c en la región de la extremidad posterior), que estabilizan la expresión de FGF10 en estos sitios (fig. 16-7; Ohuchi y col. 1997; Kawakami y col. 2001).

Especificación de extremidad anterior o de extremidad posterior: Tbx4 y Tbx5

Los esbozos de las extremidades deben ser especificados como extremidad anterior o extremidad posterior. ¿Cómo son distinguidos estos dos tipos de esbozos de extremidades? En 1996, Gibson-Brown y colegas hicieron una correlación tentadora: el gen que codifica el factor de transcripción **Tbx5** es transcrito en las extremidades anteriores del ratón, mientras que el gen que codifica el factor de transcripción estrechamente relacionado **Tbx4** es expresado en las extremidades posteriores.* ¿Podrían estos dos factores de transcripción estar involucrados en dirigir la especificidad de la extremidad anterior versus la de la extremidad posterior? Los datos de pérdida de función fueron ambiguos: humanos heterocigotas para el gen *TBX5* tienen el síndrome de Holt-Oram, caracterizado por anomalías del corazón y de los miembros superiores (Basson y col. 1996; Li y col. 1996). Las extremidades inferiores no están afectadas, pero ninguna de las extremidades superiores se transformó en un par de extremidades inferiores.

Sin embargo, en 1998 y en 1999, varios laboratorios (Ohuchi y col. 1998; Logan y col. 1998; Takeuchi y col. 1999; Rodríguez-Esteban y col. 1999, entre otros) proporcionaron evidencia de ganancia de función que indica que Tbx4 y Tbx5 especifican las extremidades posteriores y las extremidades anteriores, respectivamente. En primer lugar, si bolitas que secretaban FGF eran utilizadas para inducir una extremidad ectópica entre los esbozos de la extremidad anterior y posterior, el tipo de extremidad producida estuvo determinado por la proteína Tbx expresada. Los esbozos inducidos mediante la colocación de bolitas de FGF cerca de la extremidad posterior (opuesta al somita 25) expresaron *Tbx4* y se convirtieron en extremidades posteriores. Los esbozos inducidos cerca de la extremidad anterior (opuestos al somita 17) expresaron *Tbx5* y se desarrollaron como extremidades anteriores (alas). Los esbozos inducidos en el centro del tejido del flanco expresaron *Tbx5* en la porción anterior de la extremidad y *Tbx4* en la porción posterior de la extremidad. Estas extremidades se desarrollaron como estructuras quiméricas, con la parte anterior asemejándose a una extremidad anterior y la parte posterior asemejándose a la extremidad posterior (fig. 16-8). Además, cuando se le hizo expresar *Tbx4* a un embrión de pollo en todo el flanco del tejido (mediante la infección del tejido con un virus que expresó *Tbx4*), las extremidades inducidas en la región anterior de flanco a menudo llegaron a ser patas en lugar de alas. Por lo tanto, Tbx4 y Tbx5 parecen ser críticos en instruir a las extremidades para llegar a ser extremidades posteriores y extremidades anteriores, respectivamente.

Sin embargo, los genes Tbx no son la historia completa de la especificación de la extremidad. Los experimentos de trasplante han demostrado que la especificación de la extremidad se produce más temprano que la primera aparición de la proteína Tbx4 o Tbx5 y que debe de haber otros genes que activan a los genes *Tbx4* y *Tbx5* en sus posiciones respectivas (Saito y col. 2002). Todavía la investigación continúa descubriendo los mecanismos por los cuales la extremidad anterior llega a ser distinta de la extremidad posterior.

SITIO WEB 16.2 **Especificación de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores (Specifying forelimbs and hindlimbs).** Mientras que Tbx4 y Tbx5 son centrales para la especificación del tipo de miembro, todavía se necesita saber cómo es-

* Tbx significa caja T. El gen *T* (*Brachyury*) y sus parientes tienen una secuencia que codifica este dominio específico de unión al DNA.

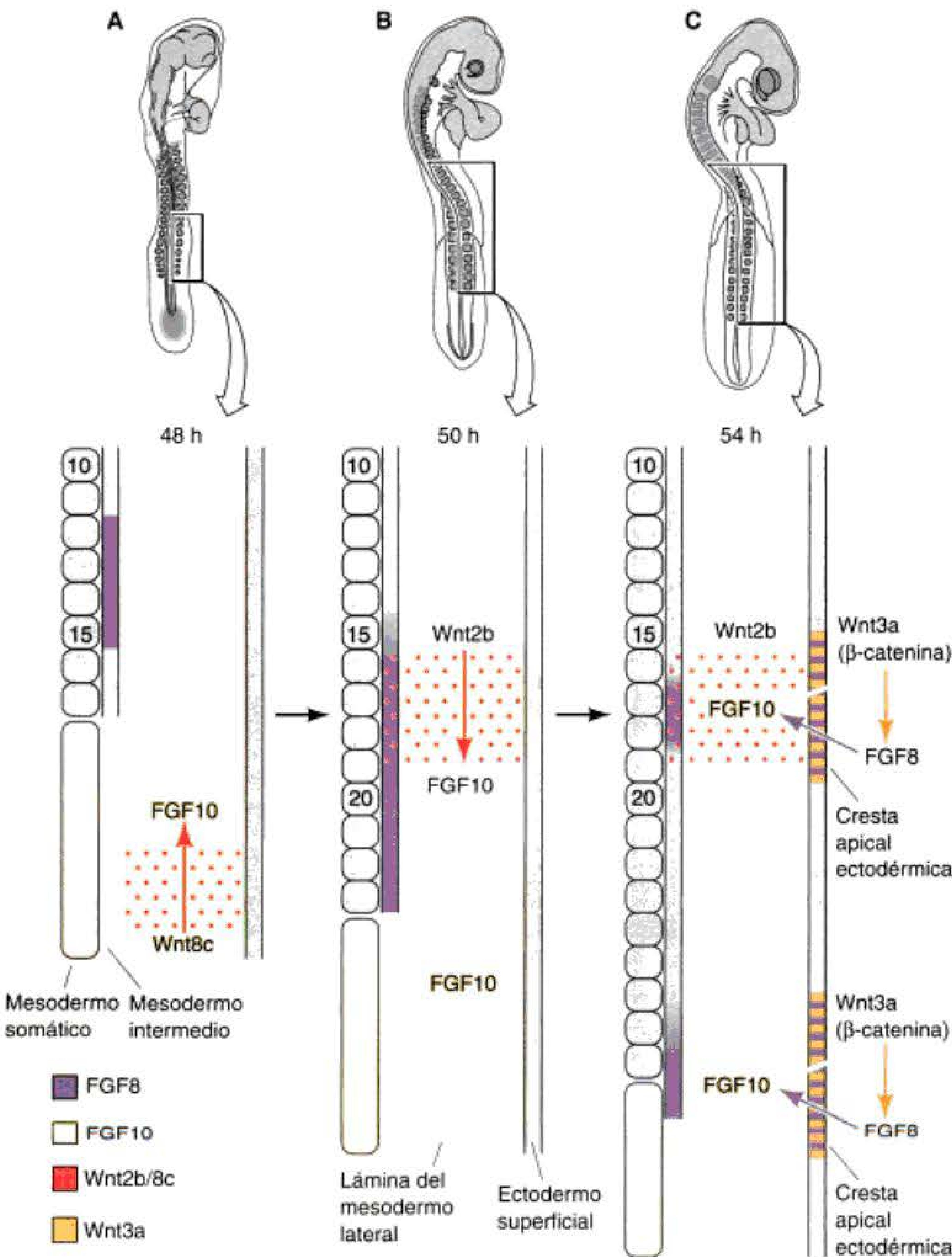


Fig. 16-7. Modelo molecular para el inicio del esbozo de la extremidad en el pollo entre las 48 y 54 horas de gestación. **A.** La expresión de FGF10 se observa primero a lo largo de la lámina del mesodermo lateral. Ésta es estabilizada por Wnt8c en el área donde se forman las extremidades posteriores. **B.** La síntesis de FGF10 es estabilizada por las acciones de Wnt2b en la región donde se formarán las extremidades anteriores. **C.** FGF10 desde estas dos regiones de la lámina del mesodermo lateral induce a FGF8 en la cresta apical ectodérmica (CAE). Esta inducción es llevada a cabo a través de una vía que involucra a Wnt3a en el ectodermo que responde. FGF8 secretado desde la CAE induce la continua expresión mesodérmica de FGF10. Los papeles de FGF8 en el mesodermo intermedio (MI) en inducir o mantener la expresión de Wnt son inciertos. MS, Mesodermo somático; ES, ectodermo superficial. (Según Kawakami y col. 2001.)

tos factores de transcripción llegan a ser expresados en sus respectivos esbozos de extremidades y qué hacen ellos para producir diferentes extremidades.

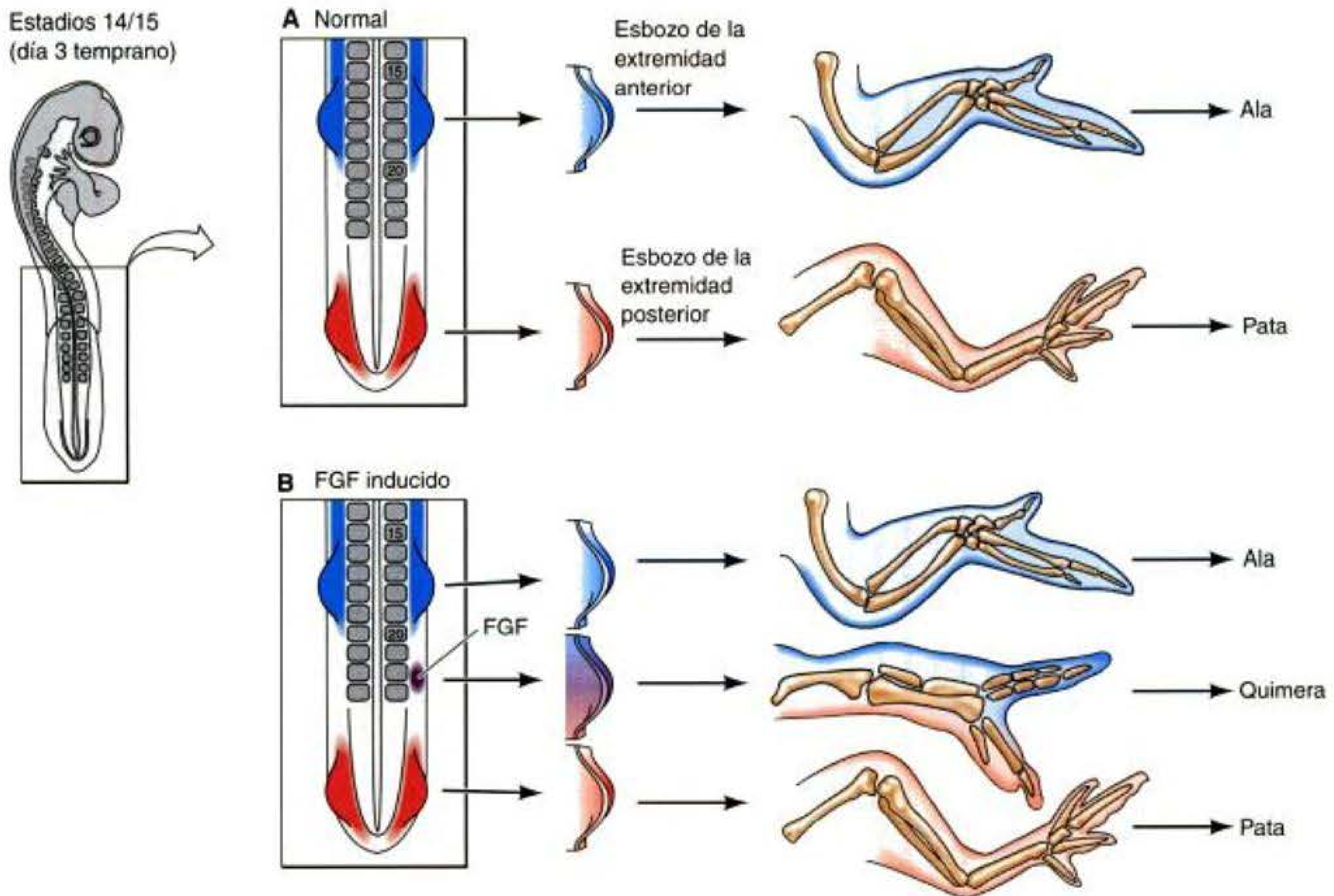
Generación del eje proximodistal de la extremidad

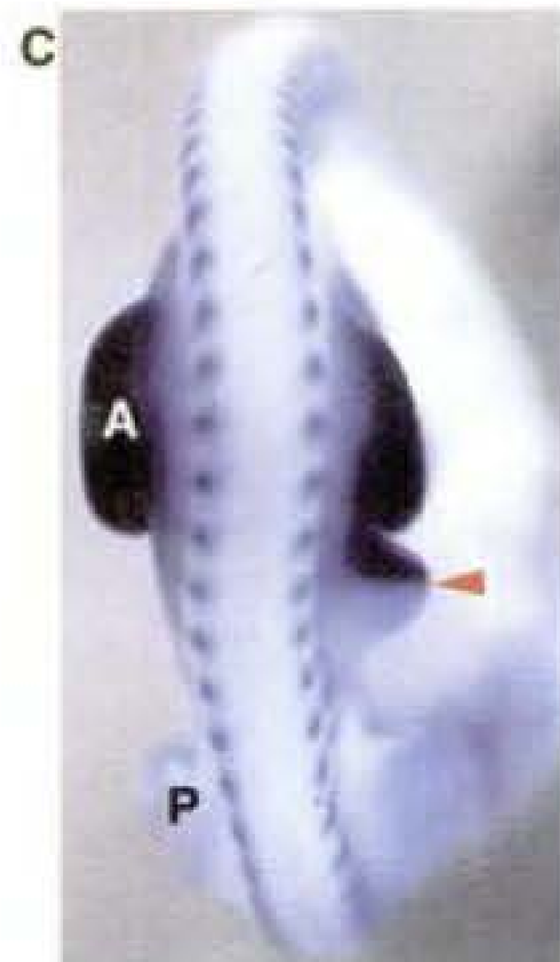
La cresta apical ectodérmica

Cuando las células mesenquimáticas ingresan en el campo de la extremidad, secretan FGF10 que induce al ectodermo que las recubre a formar una estructura denominada la **cresta apical ectodérmica (CAE)** (fig. 16-9; Saunders 1948; Kieny 1960; Saunders y Reuss 1974). Esta cresta corre a lo largo del margen distal del esbozo del miembro y será el principal centro de señalización para la extremidad en desarrollo. Sus papeles incluyen: 1) el mantenimiento del mesénquima por debajo de ésta en una fase plástica y proliferativa que permita el crecimiento en longitud (proximodistal) de la extremidad; 2) el mantenimiento de la expresión de aquellas moléculas que generan el eje anteroposterior (pulgar-meñique), y 3) la interacción con las proteínas que especifican los ejes anteroposterior y dorsoventral de modo tal que a cada célula se le dan instrucciones sobre cómo diferenciarse.

El crecimiento proximodistal y la diferenciación del esbozo de la extremidad se hacen posibles por una serie de interacciones entre la CAE y el mesénquima del esbozo de la extremidad directamente debajo de ésta (200 μm). Este mesénquima distal es denominado con frecuencia el mesénquima de la **zona de progreso (ZP)**, debido a que su actividad proliferativa extiende el esbozo de la extremidad (Harrison 1918; Saunders 1948). Estas interacciones fueron demostradas mediante resultados de varios experimentos en embriones de pollo (fig. 16-10):

1. Si la CAE es extirpada en cualquier momento durante el desarrollo del miembro, se detiene el desarrollo adicional de los componentes esqueléticos distales de la extremidad.







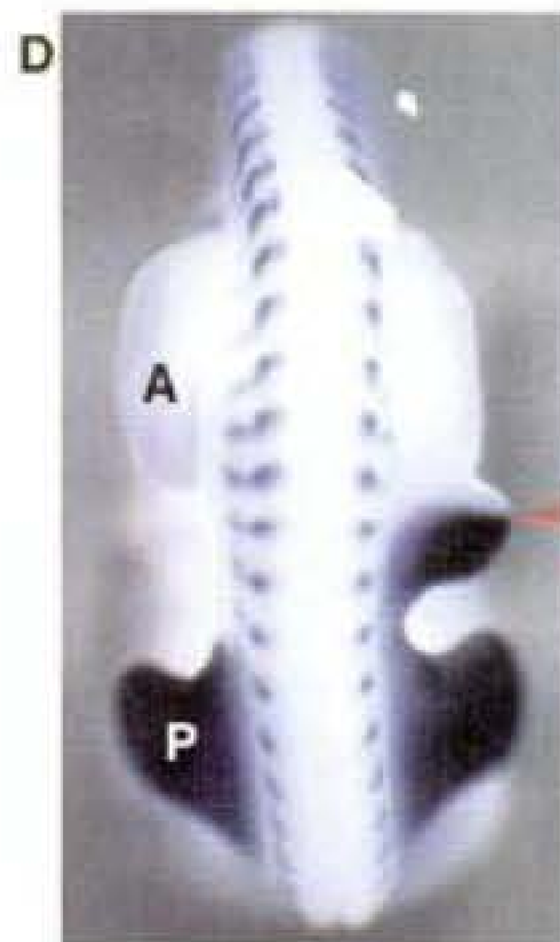




Fig. 16-8. Especificación del tipo de extremidad por Tbx4 y Tbx5. **A.** Las hibridaciones in situ muestran que durante el desarrollo normal del pollo, Tbx5 (azul) es encontrado en la parte anterior de la lámina del mesodermo lateral, mientras que Tbx4 (rojo) es hallado en la región posterior de la lámina del mesodermo lateral. Esbozos de extremidad que contienen Tbx5 producen alas, mientras que esbozos de extremidad que contienen Tbx4 generan patas. **B.** Si es inducido un nuevo esbozo de extremidad con una bolita que secreta FGF, el tipo de extremidad formada dependerá de qué gen Tbx es expresado en el esbozo del miembro. Si es colocada entre las regiones de expresión de *Tbx4* y *Tbx5*, la bolita inducirá la expresión de *Tbx4* hacia posterior y de *Tbx5* hacia anterior. El esbozo de extremidad resultante también expresará *Tbx5* hacia anterior y *Tbx4* hacia posterior y generará una extremidad quimérica. **C.** Expresión de *Tbx5* en los esbozos de la extremidad anterior (a, ala) y en la porción anterior de un esbozo de miembro inducido por una bolita secretora de FGF. (El nivel de somita puede ser determinado mediante la tinción para el mRNA de *Mrf4*, que está localizado en los miotomas.) **D.** Expresión de *Tbx4* en los esbozos de la extremidad posterior (p, pata) y en la porción posterior de un esbozo de extremidad inducido por FGF. **E, F.** Una extremidad quimérica inducida por una bolita de FGF contiene estructuras de ala anteriores y estructuras de pata posteriores. **F.** Se encuentra en un estadio de desarrollo tardío, después de la formación de plumas. (**A, B,** Ohuchi y col. 1998; Ohuchi y Noji 1999; **C-F,** fotografías cortesía de S. Noji.)



Fig. 16-9. Microfotografía electrónica de barrido de un esbozo de extremidad anterior temprano de pollo, con su cresta apical ectodérmica en el primer plano. (Microfotografía cortesía de K. W. Tosney.)

2. Si se injerta una CAE extra sobre un esbozo de extremidad existente, se forman estructuras supernumerarias, por lo general, hacia el extremo distal de la extremidad.
3. Si se coloca mesénquima de la pata directamente debajo de la CAE del ala, se desarrollan estructuras distales de la extremidad posterior (dedos de la pata) en la punta de la extremidad. (Sin embargo, si este mesénquima es colocado lejos de la CAE, el mesénquima de la extremidad posterior –pata– se integra en las estructuras del ala.)
4. Si el mesénquima de la extremidad es reemplazado por debajo de la CAE por mesénquima que no pertenece a ninguna extremidad, se produce la regresión de la CAE y se detiene el desarrollo de la extremidad.

Por lo tanto, aunque las células mesenquimáticas inducen y mantienen la CAE y determinan el tipo de extremidad a ser formada, la CAE es responsable por la evaginación y desarrollo continuo del miembro (Zwilling 1955; Saunders y col. 1957; Saunders 1972; Krabbenhoft y Fallon 1989). La CAE mantiene a las células mesenquimáticas directamente debajo de ésta en un estado de proliferación mitótica y evita que ellas formen cartílago. Hurle y colaboradores (1989) hallaron que si extirpaban una pequeña región de la CAE en una región que caería normalmente entre los dígitos de la pata del pollo, surgía un dígito extra en esta posición.*

* Cuando se refiere a la mano, se tiene un grupo ordenado de nombres que especifican cada dedo (*digitus pollicis, d. indicis, d. medius, d. annularis, y d. minimus*, respectivamente, desde el pulgar al meñique). No existe tal nomenclatura para los dígitos del pie. Los dígitos del pie, desde el *hallux* al dedo pequeño, deberían ser denominados *porcellus fori, p. domi, p. carnivorus, p. nonvoratus y p. plorans domi*, respectivamente.

FGF en la inducción y mantenimiento de la CAE

Los FGF son críticos para la inducción, el mantenimiento y la función de la cresta apical ectodérmica. La principal proteína que induce la CAE es FGF10 (Xu y col. 1998; Yonei-Tamura y col. 1999). FGF10 es capaz de inducir la CAE en el ectodermo competente entre los lados dorsal y ventral del embrión. El límite donde el ectodermo dorsal y el ectodermo ventral se encuentran es crítico para el posicionamiento de la CAE. En mutantes en los que el esbozo de la extremidad es dorsalizado y no hay confluencia dorsoventral (como en el mutante de pollo *limbless* –sin extremidad), la CAE no se forma y se detiene el desarrollo de la extremidad (Carrington y Fallon 1988; Laufer y col. 1997; Rodriguez-Esteban y col. 1997; Tanaka y col. 1997).

FGF10 producido por el mesénquima subyacente induce la formación de la CAE y al mismo tiempo induce a la CAE a sintetizar y secretar FGF8 (fig. 16-11). FGF8 actúa para mantener el estado mitótico de las células mesenquimáticas por debajo de ésta, haciendo que estas células continúen expresando FGF10. Por lo tanto, se establece un circuito de retroalimentación positivo: FGF10 en el mesénquima induce a FGF8 en la CAE y FGF8 en la CAE mantiene la expresión de FGF10 en el mesénquima. Cada uno de los FGF activa la síntesis del otro (véase fig. 16-7; Mahmood y col. 1995; Crossley y col. 1996; Vogel y col. 1996; Ohuchi y col. 1997; Kawakami y col. 2001). La continua expresión de estos FGF mantiene la mitosis en el mesénquima por debajo de la CAE.

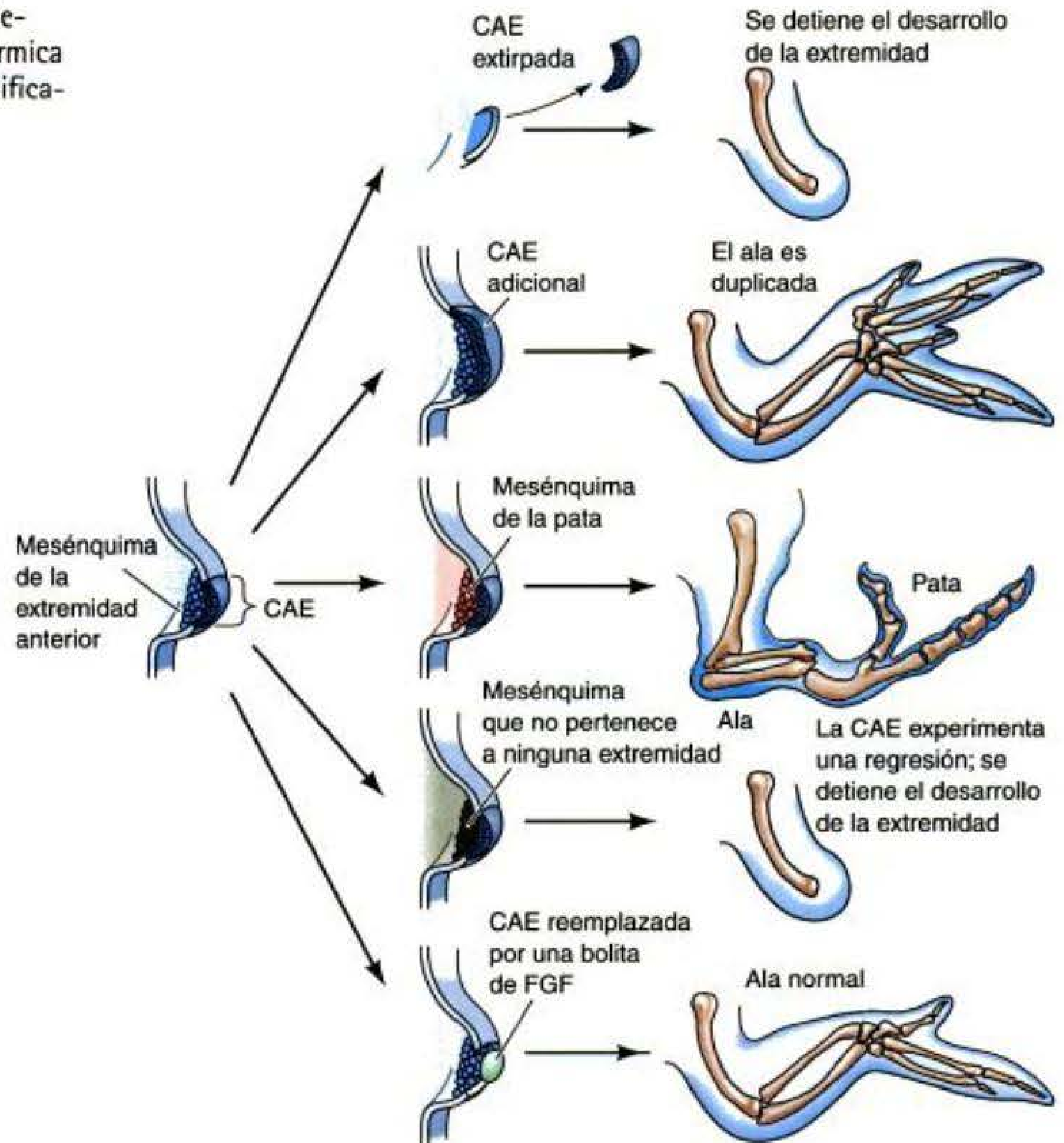
Como se muestra en la figura 16-7, el *mesodermo intermedio* puede estabilizar a las proteínas Wnt que inician la cascada de FGF. Mientras que esto no ha sido demostrado a nivel molecular, hay evidencia de los genetistas y de los embriólogos experimentales que sugiere que el conducto de Wolff (néfrico) puede ser importante en la inducción de la extremidad. En primer lugar, la extirpación del conducto de Wolff da como resultado la ausencia del desarrollo de la extremidad (Muchmore 1957; Stephens y McNulty 1981; Geduspan y Solursh 1992; Smith y col. 1996). En segundo lugar, los estudios de explantos de tejidos de embriones de anfibios sugieren una relación entre la formación de la extremidad y la presencia de los túbulos néfricos (Muchmore 1957; Lash y Saxén 1972). En cuarto lugar, hay varios síndromes genéticos y teratogénicos en los que fracasa la formación del riñón y de la extremidad.

SITIO WEB 16.3 **Inducción de la CAE (Induction of the AER).** La inducción de la CAE es un acontecimiento complejo que involucra la interacción entre los compartimentos dorsal y ventral del ectodermo. La vía de Notch puede ser crítica en este proceso. La expresión ectópica de genes en esta vía puede causar la ausencia o la duplicación de las extremidades.

Especificación del mesodermo de la extremidad: determinación de la polaridad proximodistal de la extremidad

En 1948, John Saunders hizo una simple y profunda observación: si la CAE es extirpada desde un estadio tem-

Fig. 16-10. Resumen de experimentos que demuestran el efecto de la cresta apical ectodérmica (CAE) sobre el mesénquima subyacente. (Modificado de Wessells 1977.)



prano de esbozo de ala, solamente se forma un húmero. Si la CAE es extirpada un poco más tarde, se forma el húmero, el radio y el cúbito (fig. 16-12; Saunders 1948; Iten 1982; Rowe y Fallon 1982). Sin embargo, la explicación de cómo esto sucede no ha sido fácil. En primer lugar, se tuvo que determinar si la información posicional para la polaridad proximodistal reside en la CAE o en el mesénquima de la zona de progreso. Mediante una serie de trasplantes recíprocos, se encontró que esta especificidad se localiza en el mesénquima. Si la CAE *había* proporcionado la información posicional –instruyendo de algún modo al mesodermo sin diferenciar por debajo de ésta en cuanto a qué estructura producir– entonces CAE más viejas combinadas con mesodermo más joven deberían haber producido extremidades con supresiones en el medio, mientras que CAE más jóvenes combinadas con mesodermo más viejo deberían haber producido duplicaciones de estructuras. Esto no fue lo que sucedió; en su lugar, se formaban extremidades normales en ambos experimentos (Rubin y Saunders 1972). Pero cuando la zona de progreso en su totalidad (incluidos el mesodermo y la CAE) de un embrión temprano es colocada sobre el esbozo de la extremidad de un embrión en estadio tardío, se producen nuevas estructuras proximales más allá de las que estaban presentes. Por el contrario, cuando zonas de progreso viejas son agregadas a esbozos de extremidades jóvenes, se desarrollan estructuras distales inmediatamente, de modo tal que se ven dígitos que surgen desde el húmero sin un cúbito o radio interpuestos (fig. 16-13; Summerbell y Lewis 1975).

Pero, ¿cómo hace el mesénquima para especificar el eje proximodistal? Se han propuesto dos modelos principales para explicar este fenómeno. Uno pone énfasis en la dimensión del *tiempo*, mientras que el otro pone énfasis en la dimensión del *espacio*.

El **modelo de la zona de progreso** postula que cada célula mesodérmica es especificada de acuerdo con el

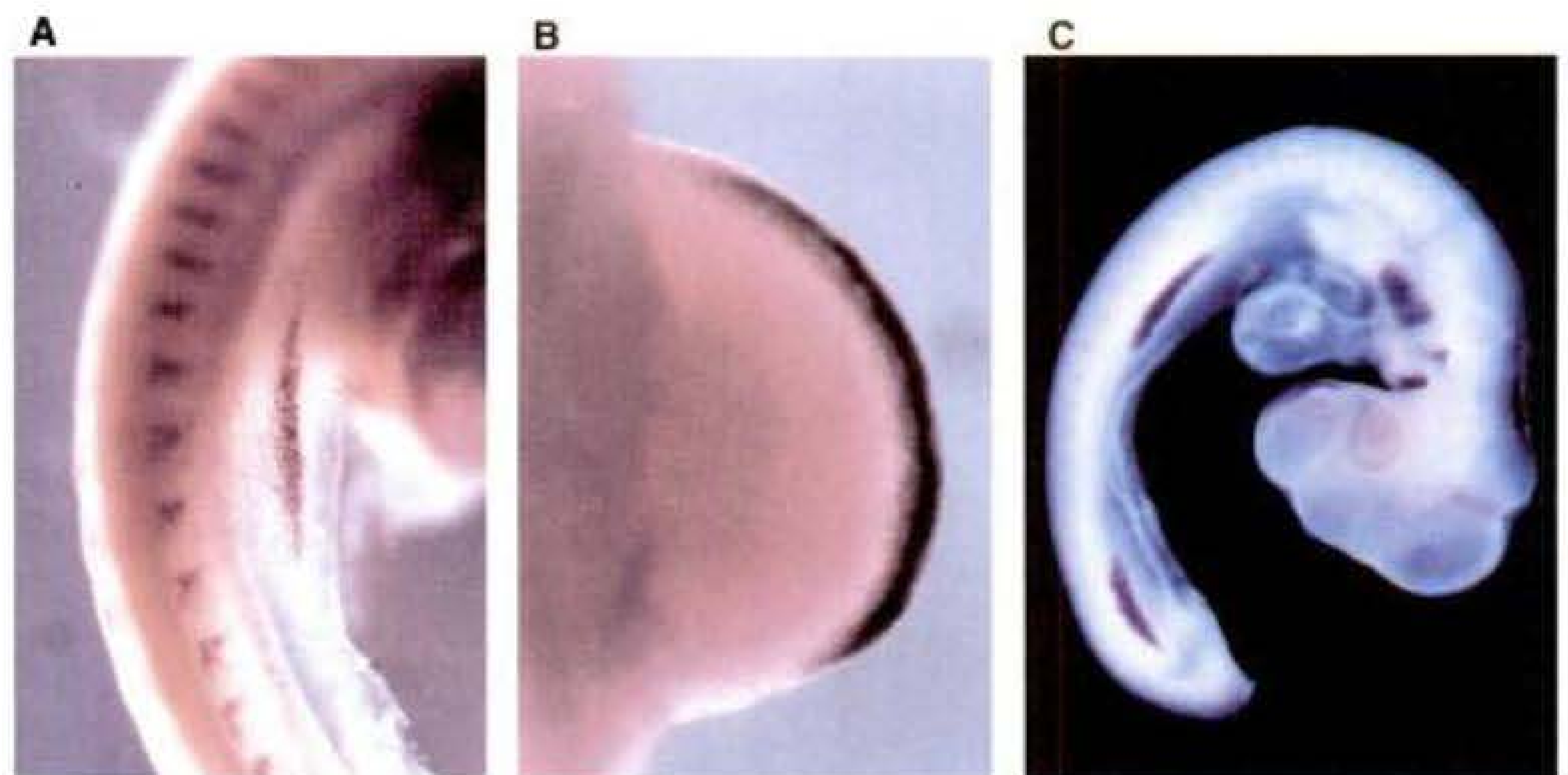


Fig. 16-11. FGF8 en la cresta apical ectodérmica. **A.** Hibridación in situ que muestra la expresión del mensajero de FGF8 en el ectodermo a medida que comienza a formarse el esbozo de la extremidad. **B.** Expresión del RNA de FGF8 en la CAE, la fuente de señales mitóticas hacia el mesodermo subyacente. **C.** En un embrión de pollo normal de 3 días, FGF8 es expresado en la cresta apical ectodérmica de los esbozos de las extremidades anteriores y posteriores. Éste también es expresado en varios lugares en el embrión, incluidos los arcos faríngeos. (**A** y **B**, fotografías cortesía de J. C. Izpisúa-Belmonte; **C**, fotografía cortesía de A. López-Martínez y J. F. Fallon.)

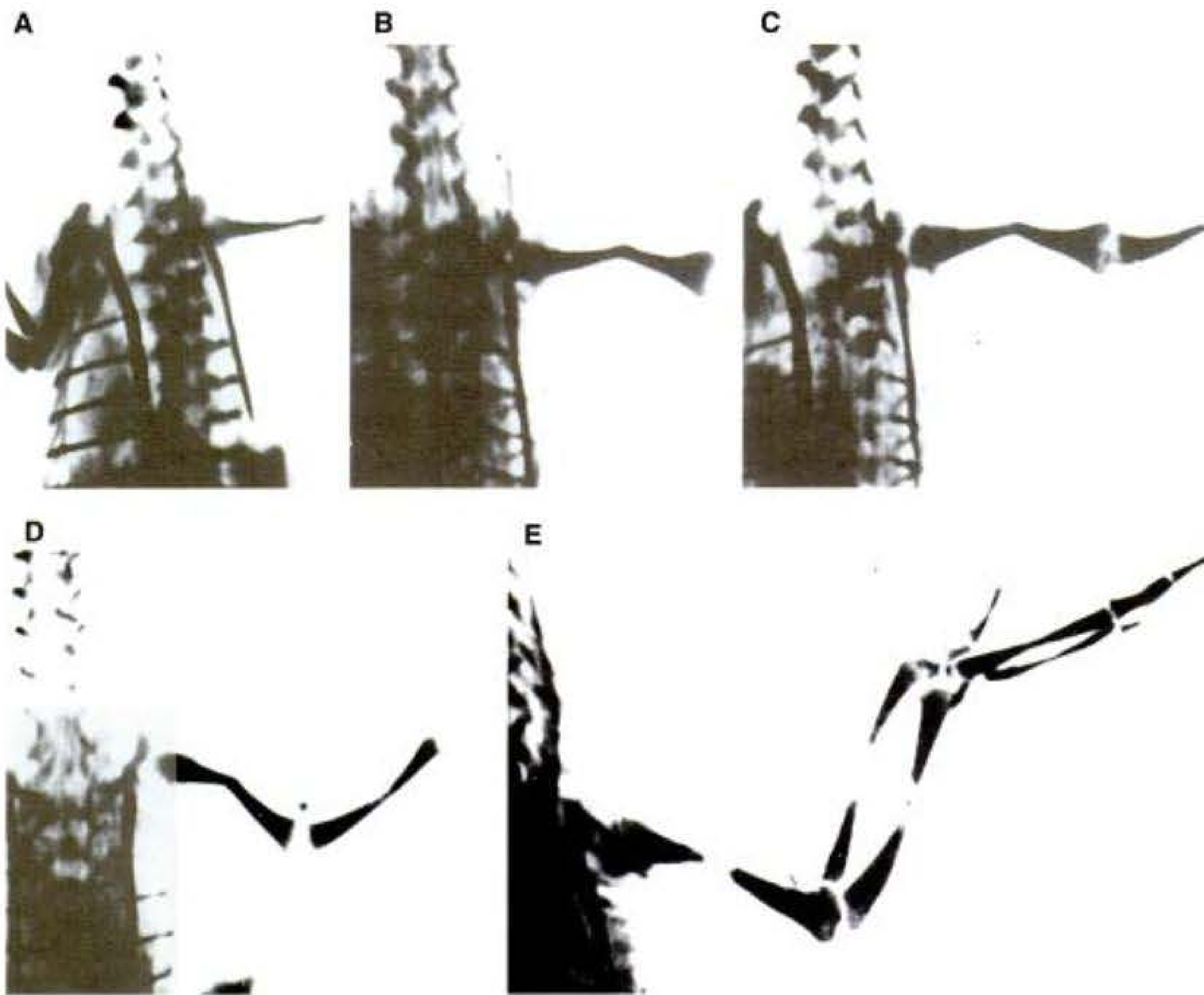


Fig. 16-12. Vistas dorsales de patrones esqueléticos del pollo después de la extirpación de la totalidad de la CAE del esbozo del ala derecha de los embriones de pollo en varios estadios. La última foto (E) es de un esqueleto de ala normal. (De Iten 1982; fotografías cortesía de L. Iten.)

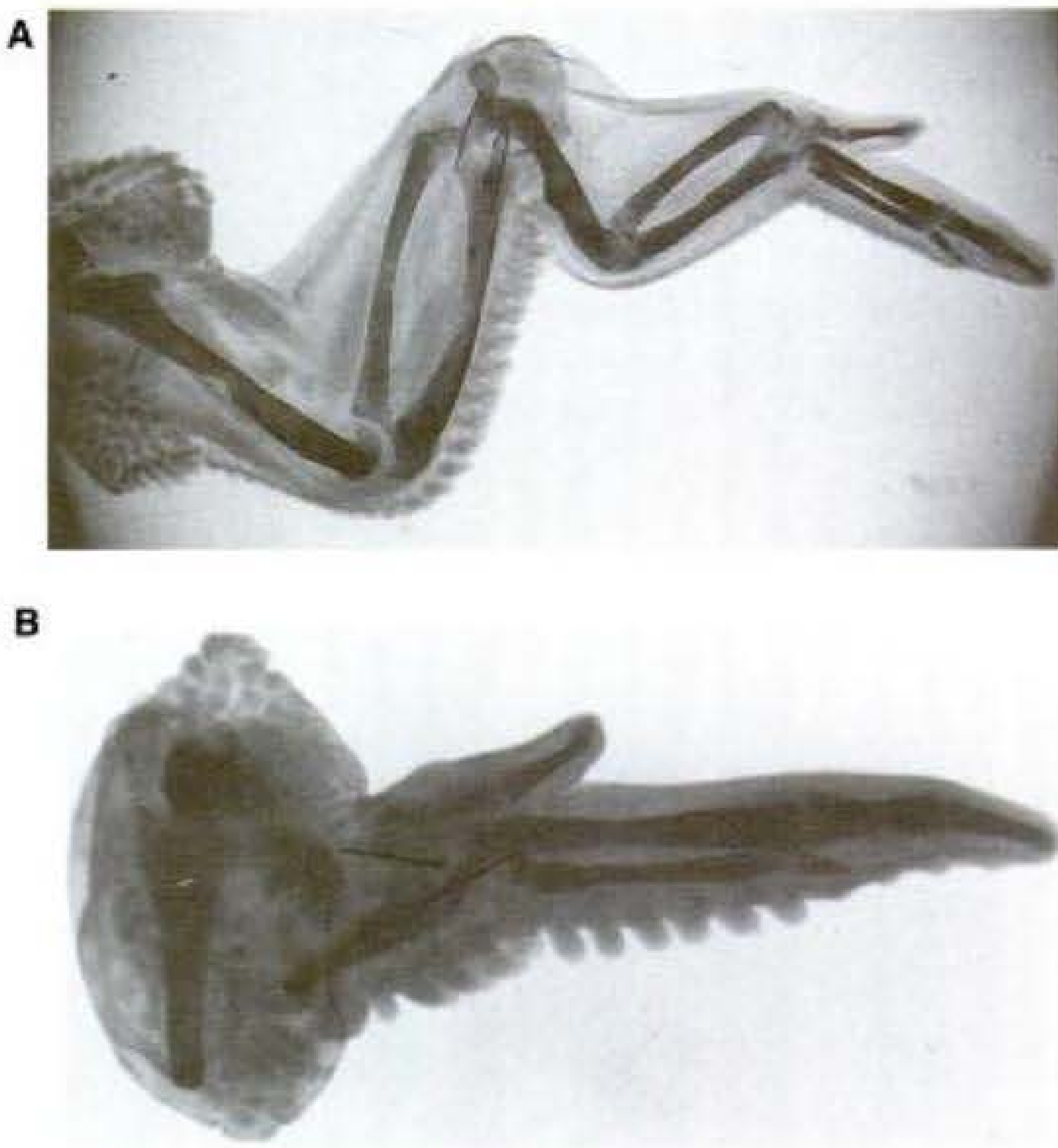


Fig. 16-13. Control de la especificación proximodistal por el mesénquima de la zona de progreso. **A.** Grupo extra de cúbito y radio formado cuando una zona de progreso de esbozo de ala temprano fue trasplantada a un esbozo de ala tardío que ya tenía formado cúbito y radio. **B.** Carencia de estructuras intermedias vista cuando una zona de progreso de esbozo de ala tardío fue trasplantada hacia un esbozo de ala temprano. Los ganchos indican las localizaciones de los injertos. (De Summerbell y Lewis 1975; fotografías cortesía de D. Summerbell.)

tiempo que ésta pasa dividiéndose en la zona de progreso. Cuanto mayor es el tiempo que una célula pasa en la zona de progreso, mayor es el número de mitosis que alcanza y más distal es su especificación. Debido a que la zona de progreso se mantiene del mismo tamaño, las células deben salir de la ZP constantemente a medida que crece la extremidad; una vez que ellas la dejan, pueden formar cartílago. Por lo tanto, las primeras células en dejar la zona de progreso se convierten en el estilópodo, mientras que las últimas células en dejarla se convierten en el autópodo (fig. 16-14A; Summerbell 1974; Wolpert y col. 1979). De acuerdo con este modelo, la extirpación de la CAE significa que las células de la zona de progreso no se pueden dividir más y que no pueden ser especificadas posteriormente, formándose solamente estructuras proximales.

Aunque el modelo de la zona de progreso ha sido el medio predominante para explicar la polaridad de la extremidad, éste no explica datos de experimentos recientes en los que se impidió que el mesénquima de la zona de progreso se dividiera en ratones carentes de *fgf8* y *fgf4* (los cuales eran expresados en la CAE). En las extremidades de estos ratones, los elementos proximales estaban completamente ausentes, mientras que los elementos distales estaban presentes y a menudo eran normales. Este resultado no se podría explicar por un modelo en el cual la especificación de los elementos distales dependiera del número de mitosis en la zona de progreso (Sun y col. 2002). Además, cuando células individuales de la ZP eran marcadas con un colorante, la progenie de cada célula estuvo limitada a un segmento particular de la extremidad. Por ejemplo, la punta del esbozo temprano de la extremidad proporciona solo células al autópodo (Dudley y Tabin 2002). Este hallazgo sugiere que la especificación fue temprana y que el tiempo que pasa en la zona de progreso no específica la posición celular. Además, se

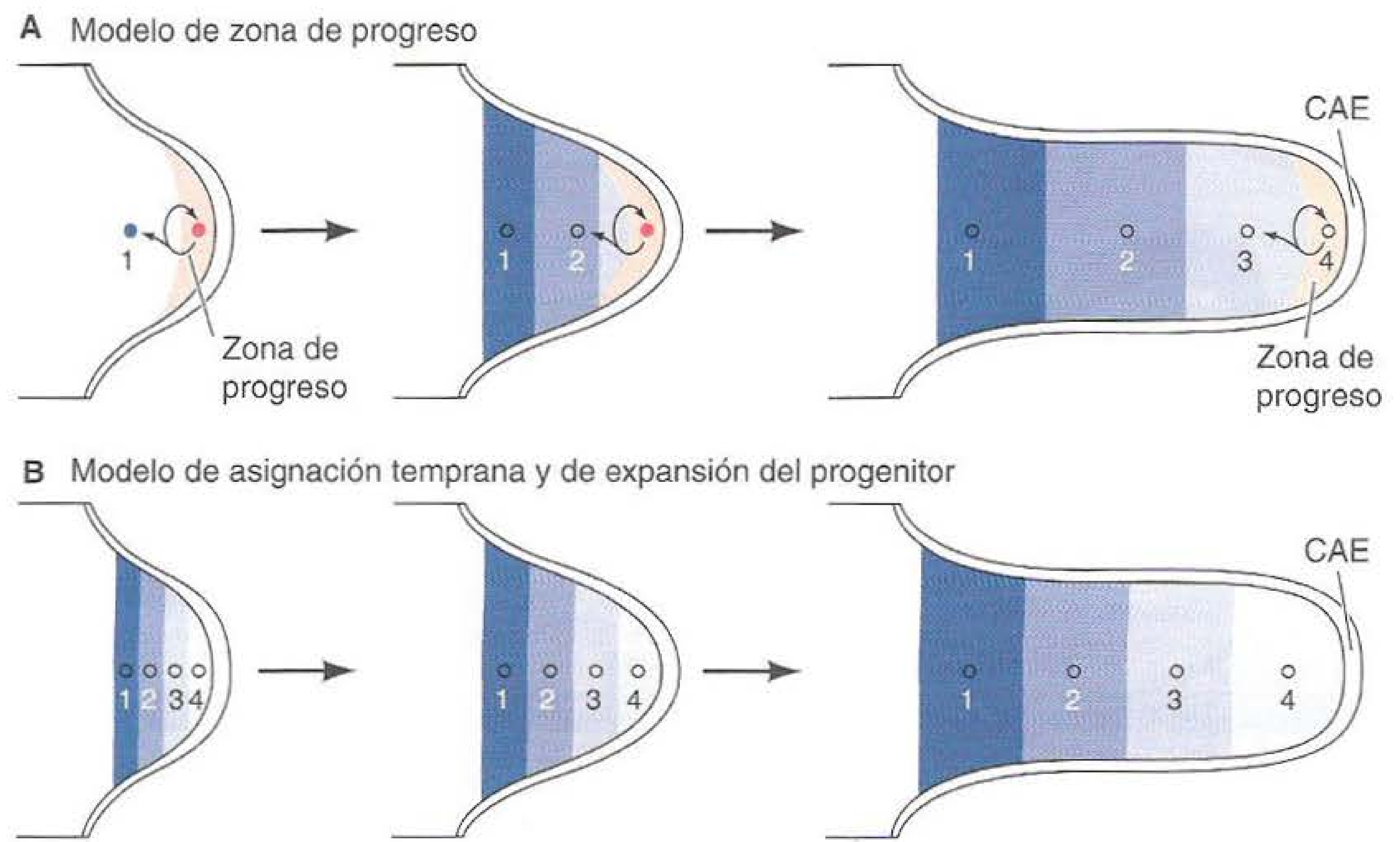


Fig. 16-14. Dos modelos de especificación mesodérmica del eje proximodistal de la extremidad. **A.** Modelo de la zona de progreso, por el cual el tiempo que una célula mesodérmica se mantiene en la zona de progreso especifica su posición. **B.** Modelo de asignación temprana y de expansión del progenitor, por el cual los territorios del esbozo de la extremidad son establecidos muy temprano y las células crecen en cada una de estas áreas.

observa división celular en todo el esbozo del miembro, no solamente en la zona de progreso.

Gail Martin y Cliff Tabin han propuesto un **modelo de asignación temprana y de expansión del progenitor** (fig. 16-14B) como una alternativa al modelo de la zona de progreso. Aquí, las células de la totalidad del esbozo temprano de la extremidad ya están especificadas; divisiones celulares posteriores simplemente expanden a estas poblaciones celulares. Los efectos de la extirpación de la CAE son explicados por la observación de Rowe y col. (1982) que cuando la CAE es quitada del esbozo de la extremidad, hay apoptosis por aproximadamente 200 μm. Si se extirpa la CAE de un esbozo de extremidad temprana, antes de que se hayan expandido las poblaciones de células mesenquimáticas, las células especificadas a ser zeugópodo y autópodo mueren y se mantienen solo las células ya especificadas a ser estilópodo. En estadios embrionarios tardíos, el esbozo de la extremidad crece y la región de 200 μm de apoptosis solamente suprime el autópodo. La investigación en marcha en la actualidad debe distinguir la contribución de estos mecanismos a la especificación del eje A-P en la extremidad.

Genes Hox, genes meis y especificación del eje proximodistal

Los productos de los genes Hox ya han desempeñado un papel en la especificación del lugar donde se formarán las extremidades. Ahora ellos desempeñarán un segundo papel al especificar si una célula mesenquimática particular llegará a ser estilópodo, zeugópodo o autópodo.

Las porciones 5' (tipo *AbdB*) (parálogos 9-13) de los complejos Hoxa y Hoxd parecen ser activas en el esbozo de la extremidad anterior de ratón. Basados sobre los patrones de expresión de estos genes y sobre mutaciones producidas naturalmente y de knockout génico, Davis y colegas (1995) propusieron un modelo por el cual estos genes Hox especifican la identidad de una región de la extremidad (fig. 16-15). Por ejemplo, cuando hacían el knockout de los cuatro locus para los genes parálogos *Hoxa-11* y *Hoxd-11*, el ratón resultante carecía de cúbito y de radio en sus extremidades anteriores (fig. 16-15A,B). Del mismo modo, con el knockout de los cuatro locus de *Hoxa-13* y *Hoxd-13* resultaban en una pérdida del autópodo (Fromental-Ramain y col. 1996). Los humanos homocigotas para las mutaciones de *HOXD-13* muestran anomalías de las manos y pies por las cuales los dígitos se fusionan (fig. 16-15C) y los pacientes humanos con alelos mutantes homocigotas de *HOXA-13* también tienen deformidades de sus autópodos (Muragaki y col. 1996; Mortlock e Innis 1997). En ratones y humanos, el autópodo (la porción más distal de la extremidad) es afectado por la pérdida de función de los genes Hox más 5'.

El mecanismo por el cual los genes Hox pueden especificar el eje proximodistal todavía no es entendido, pero una clave viene del análisis de *Hoxa-13* de pollo. La expresión ectópica de este gen (que es expresado frecuentemente en los extremos distales de los miembros en desarrollo) parece hacer a las células que lo expresan más "pegajosas". Esta propiedad podría hacer que los nódulos cartilaginosos se condensen en modos específicos (Yokouchi y col. 1995; Newman 1996).

A medida que la extremidad crece evaginándose, cambia el patrón de expresión de genes Hox. Cuando se está formando el estilópodo, *Hoxd-9* y *Hoxd-10* son expresados en el mesénquima más distal (fig.16-16; Nelson y col. 1996). Aquí, ellos son unidos por los productos de los genes *meis*, que probablemente interactúan con los productos de los genes Hox para especificar a las células como proximales (Mercader y col. 1999, 2000; Capdevila y col. 1999). Cuando se están formando los huesos del zeugópodo, el patrón cambia de manera sorprendente, exponiendo una secuencia anidada de expresión génica Hoxd. La región posterior expresa todos los genes Hoxd desde *Hoxd-9* a *Hoxd-13*, mientras que en la región anterior solo se expresa *Hoxd-9*. En la tercera fase del desarrollo del miembro, cuando se está formando el autópodo, hay una reorganización adicional de los productos génicos de Hox. *Hoxd-9* no se expresa más. En su lugar, se expresa *Hoxa-13* en el extremo anterior del esbozo de la extremidad y en una banda que marca el límite del autópodo. Los productos de *Hoxd-13* se unen con los de *Hoxa-13* en la región anterior del esbozo de la extremidad, mientras que *Hoxa-12*, *Hoxa-11* y *Hoxd-10-12* se expresan a lo largo de los dos tercios posteriores del esbozo de la extremidad. Kmita y col. (2002) han demos-

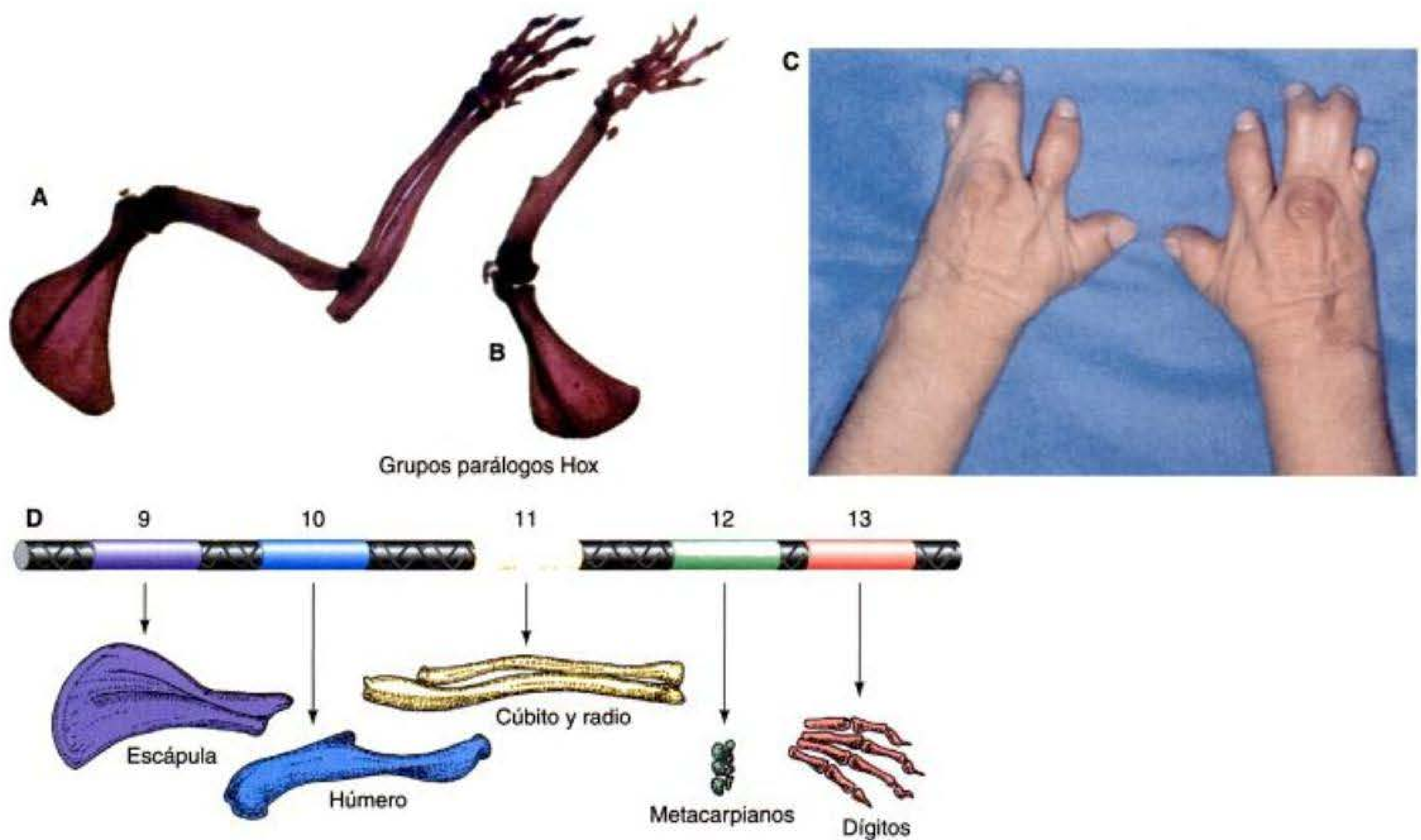


Fig. 16-15. Eliminación de los elementos óseos de la extremidad mediante la supresión de los genes Hox parálogos. **A.** Extremidad anterior de un ratón tipo salvaje. **B.** Extremidad anterior de un ratón producido con una doble mutación de modo tal que éste carece de los genes *Hoxa-11* y *Hoxd-11* funcionales. El cúbito y el radio están ausentes. **C.** El síndrome de la *sinpolidactilia* humana (muchos dedos unidos) resulta de una homocigocidad para una mutación en el locus *HOXD-13*. El síndrome humano también incluye malformaciones del sistema urogenital, que además expresan *HOXD-13*. **D.** Hipótesis que plantea que los 5' de los genes Hox parálogos especifican regiones particulares de la extremidad anterior. (**A**, **B** y **D**, según Davis y col. 1995, fotografías cortesía de M. Capecchi; **C**, de Muragaki y col. 1996, fotografía cortesía de B. Olsen.)

trado que el patrón específico autópodo de expresión Hox es controlado por una región potenciadora particular que interactúa con cada uno de los genes. Cuanto más cerca se encuentre este potenciador del gen Hox, con mayor eficacia es activado y más productos genera. Es posible que la localización de los genes Hox en el grupo Hoxd evite que se formen dígitos en cualquier lugar sino que lo hagan en el extremo distal de la extremidad.

SITIO WEB 16.4 **Genes Hox y evolución de la extremidad (Hox genes and limb evolution).** El último estadio del desarrollo de la extremidad –la formación del autópodo– está caracterizado por nuevos patrones de expresión de genes Hox. Este cambio de patrón no se observa en las aletas de los peces; esto da origen a la especulación de que la extremidad evolucionó desde la aleta mediante el cambio de los patrones de expresión de los genes Hox.

SITIO WEB 16.5 **Dinosaurios y el origen de las aves (Dinosaurs and the origin of birds).** Si las aves son descendientes de ciertos dinosaurios está sujeto a discusión en lo que concierne a la estructura de la cadera y si el autópodo del dinosaurio está hecho de los mismos dígitos como el autópodo del ave.

Especificación del eje anteroposterior de la extremidad

La zona de actividad polarizante

La especificación del eje anteroposterior de la extremidad es el cambio más temprano desde la condición pluripotente. En el pollo, este eje es especificado poco antes de que el esbozo de la extremidad sea reconocible. Hamburguer (1938) demostró que tan temprano como en el estadio de 16 somitas, el mesodermo prospectivo del ala trasplantado al área del flanco se desarrolla en una extremidad con las polaridades anteroposterior y dorsoventral del injerto donante, no con las del tejido huésped.

Varios experimentos (Saunders y Gasseling 1968; Tickle y col. 1975) sugieren que el eje anteroposterior es especificado por un pequeño bloque de células mesodérmicas cerca de la unión posterior del joven esbozo de la extremidad y la pared corporal. Esta región de mesodermo ha sido denominada la **zona de actividad polarizante (ZAP).** Cuando este tejido es tomado desde un esbozo de extremidad joven y es trasplantado hacia una posición sobre el lado anterior de otro esbozo de extremidad (fig. 16-17), el número de dígitos del ala resultante es duplicado. Además, la estructura del grupo extra de dígitos tiene una imagen en espejo con respecto a las estructuras producidas normalmente. La polaridad ha sido manteni-

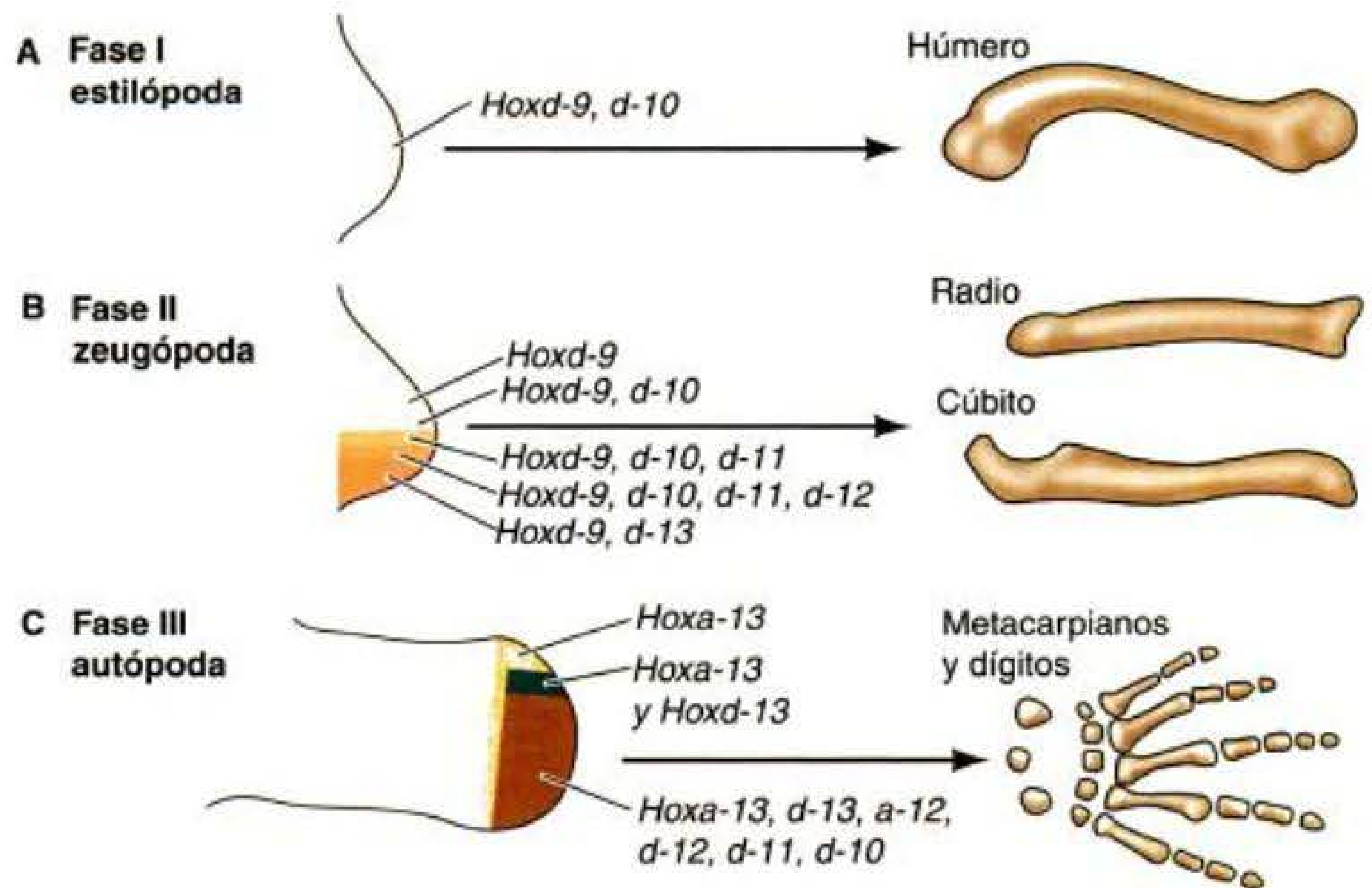


Fig. 16-16. La expresión de los genes Hox cambia durante la formación de la extremidad del tetrápodo. **A.** Durante la formación del estilópodo (fase 1), *Hoxd-9* y *Hoxd-10* se expresan en los esbozos de extremidad recién formados. **B.** Durante la formación del zeugópodo (fase II), hay una expresión anidada de los genes Hoxd de modo tal que *Hoxd-9* a través de *Hoxd-13* se expresan en la parte posterior del esbozo de la extremidad, mientras que solo *Hoxd-9* se expresa hacia anterior y hacia posterior. **C.** Inversión de la expresión de los genes Hox durante la formación del autópodo (fase III). *Hoxd-13* y *Hoxa-13* son expresados hacia anterior y hacia posterior mientras que *Hoxd-10* a través de *Hoxd-12* y *Hoxa-12* son expresados hacia posterior. (Según Shubin y col. 1997.)

da, pero la información ahora viene desde una dirección anterior y una posterior.

Sonic hedgehog define la ZAP

La investigación sobre la molécula *(s)* que otorga esta actividad polarizante sobre la ZAP llegó a ser una de las búsquedas más intensas en la biología del desarrollo. En 1993, Riddle y sus colegas demostraron por hibridación in situ que *sonic hedgehog (shh)*, un homólogo de vertebrados del gen *hedgehog* de *Drosophila*, se expresaba específicamente en la región del esbozo de la extremidad conocida como la ZAP (fig. 16-18).

Como evidencia de que esta asociación entre la ZAP y sonic hedgehog era más que tan solo una correlación, Riddle y col. (1993) demostraron que la secreción de la proteína Sonic hedgehog es suficiente para la actividad polarizante. Ellos transfectaron fibroblastos embrionarios de pollo (que normalmente nunca deberían sintetizar la proteína Shh) con un vector viral que contenía el gen *shh* (fig. 16-19). El gen llegó a ser expresado y traducido en estos fibroblastos, que luego fueron insertados bajo el ectodermo anterior de una extremidad temprana de pollo. El resultado fue la formación de dígitos duplicados en imagen en espejo como en aquellos inducidos por los trasplantes de ZAP. Más recientemente, se demostró que bolitas que contenían la proteína Sonic hedgehog causaban las mismas duplicaciones (López-Martínez y col. 1995). Por lo tanto, Sonic hedgehog parece ser el agente activo de la ZAP.

Especificación de la ZAP

Dos nuevas preguntas surgieron a partir de este descubrimiento. En primer lugar, ¿cómo llega a ser expresado *sonic hedgehog* solamente en la región posterior del esbozo de la extremidad? Y en segundo lugar, ¿qué hace éste una vez que es expresado? El gen *shh* parece ser activado por una proteína FGF que viene desde la cresta apical ectodérmica recién formada (fig. 16-20). FGF8 es secretado desde la CAE y es capaz de activar a *shh* (Heikinheimo y col. 1994; Crossley y Martin 1995). Pero ¿por qué FGF8 no activa a todas las células mesenquimáticas por debajo de la CAE? La respuesta podría residir en la competencia diferencial de ciertas células mesenquimáticas para responder a la señal de FGF.

Hay dos factores de transcripción que se encuentran en la región posterior del esbozo de la extremidad que no

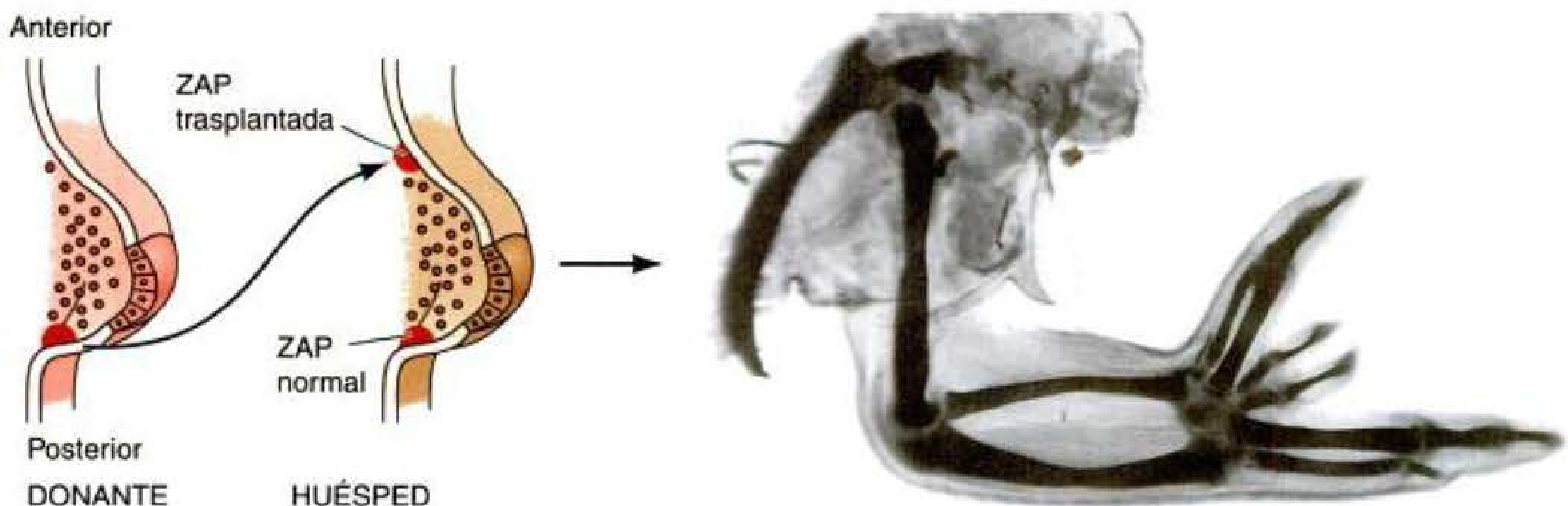


Fig. 16-17. Cuando la ZAP es injertada en el mesodermo anterior del esbozo de la extremidad, surgen dígitos duplicados como una imagen en el espejo de los dígitos normales. (De Honig y Summerbell 1985; fotografía cortesía de D. Summerbell.)



Fig. 16-18. La proteína Sonic hedgehog es expresada en la ZAP. La hibridación in situ muestra los sitios de expresión de Sonic hedgehog (flechas) en el mesodermo posterior de los esbozos de las extremidades del pollo. Éstas son precisamente las regiones que los experimentos de trasplante definieron como la ZAP. (Fotografía cortesía de R. D. Riddle.)

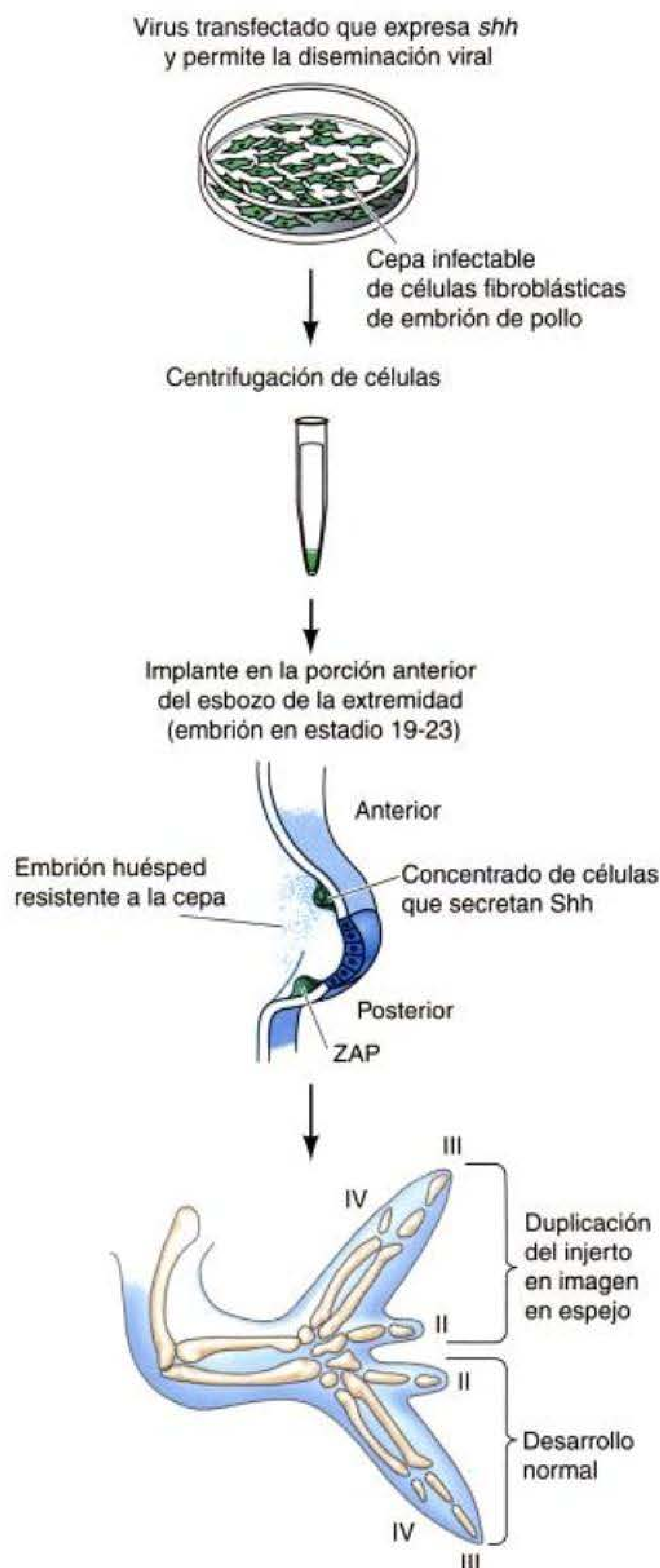


Fig. 16-19. Ensayo para la actividad polarizante de Sonic hedgehog. El gen *sonic hedgehog* fue insertado adyacente a un promotor activo de un virus de pollo y el virus recombinante fue colocado en cultivos de células fibroblásticas de embrión de pollo. Las células transfectadas viralmente fueron concentradas e implantadas en el margen anterior de un esbozo de extremidad de un embrión de pollo. Las extremidades resultantes produjeron dígitos en imagen en espejo, que muestran que la proteína secretada tenía actividad polarizante. (Según Riddle y col. 1993.)

son expresados en la porción anterior y estos factores le permiten únicamente a las células mesodérmicas *posteriores* expresar el gen *shh*. En primer lugar, Charité y colegas (1994) sugirieron que la proteína **Hoxb-8** puede ser crítica en proporcionar esta competencia restringida. El gen *Hoxb-8* normalmente se expresa en la mitad posterior del esbozo de la extremidad anterior del ratón. Sin embargo, cuando la proteína Hoxb-8 es expresada ectópicamente en todo el esbozo de la extremidad anterior, el mesodermo anterior y posterior expresan la proteína Sonic hedgehog, creando dos ZAP y duplicaciones de la extremidad anterior en imagen en espejo. El segundo factor de transcripción en la región posterior es **dHAND**. El gen *dHAND* es expresado en el mesodermo posterior del esbozo de la extremidad inmediatamente antes de que sea expresado *shh*. En ratones que carecen de *dHAND*, *shh* no se expresa en los esbozos de las extremidades y las extremidades están severamente truncadas. En cambio, la expresión ectópica de la proteína dHAND en la región anterior del esbozo de la extremidad de ratón genera una segunda ZAP y duplicaciones de dígitos (Charité y col. 2000).

Especificación de la identidad del dígito mediante interacciones celulares iniciadas por Sonic hedgehog

Cuando primero se demostró que la proteína Sonic hedgehog definía la ZAP, se pensaba que actuaba como un morfógeno. En otras palabras, se pensaba que se difundía desde la ZAP donde estaba siendo sintetizada y formaba un gradiente de concentración desde la región posterior hacia la anterior del esbozo de la extremidad. Sin embargo, las investigaciones recientes han proporcionado evidencia de que Sonic hedgehog (o su región aminoterminal activa) no se difunde fuera de la ZAP (Yang y col.

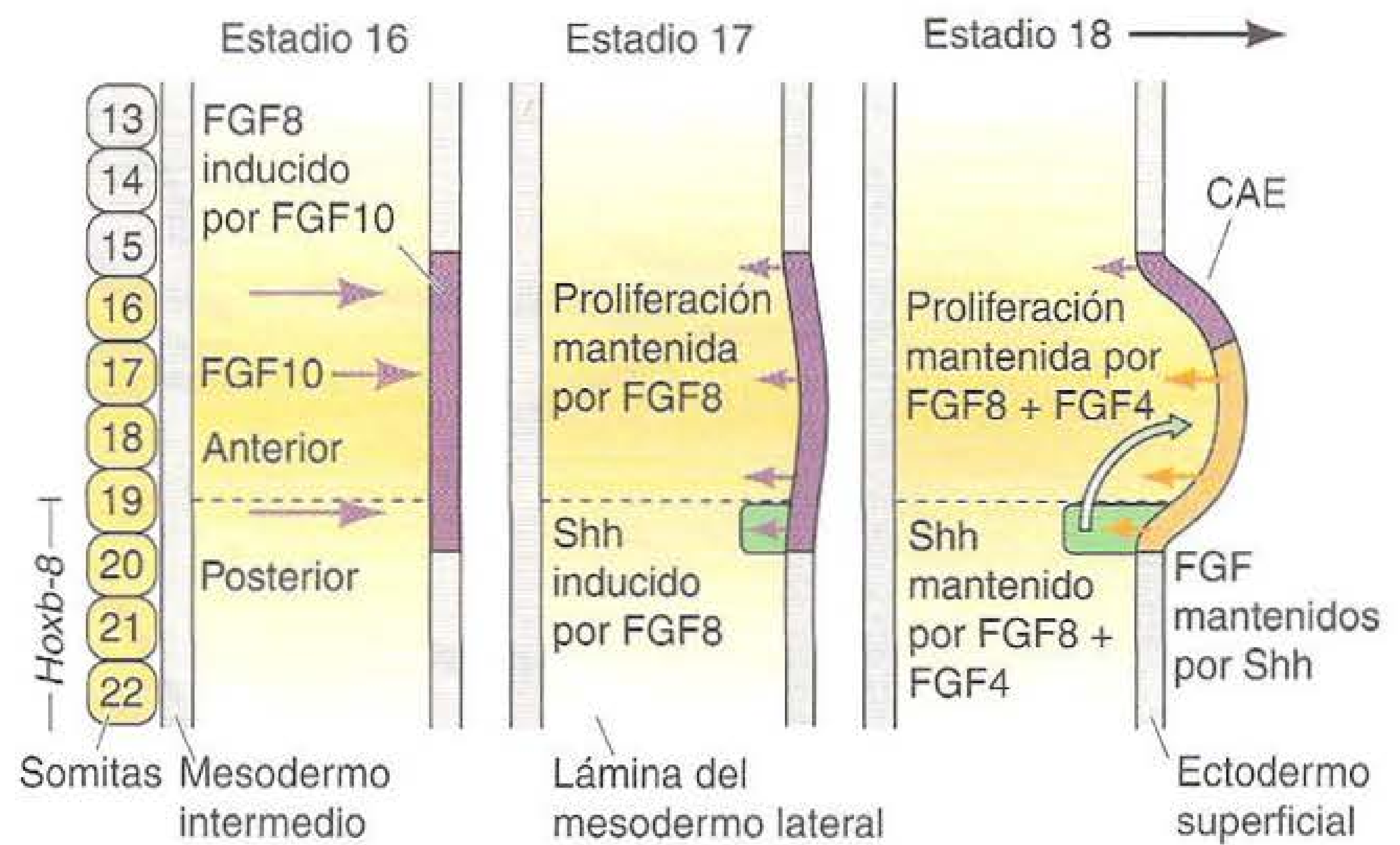


Fig. 16-20. Retroalimentación entre la CAE y la ZAP en el esbozo de la extremidad anterior. El estadio 16 (cerca de 54 horas de gestación) representa el mismo estadio de C, en la figura 16-7. Los otros dos estadios están cerca de 5 horas alejados. En el estadio 17, la CAE recién inducida secreta FGF8 hacia el mesénquima subyacente. El mesénquima que está expresando *Hoxb-8* y *dHAND* es inducido a expresar *shh* y forma de este modo la ZAP en la región posterior del esbozo de la extremidad anterior. En el estadio 18, la proteína Sonic hedgehog mantiene la expresión de FGF en la CAE, mientras que las FGF de la CAE mantienen la expresión del gen *shh*.

1997). Ahora se piensa que Sonic hedgehog funciona en, al menos, otros dos modos.

En primer lugar, Sonic hedgehog inicia y sostiene un gradiente de proteínas como BMP2 y BMP7 (Laufer y col. 1994; Kawakami y col. 1996; Drossopoulou y col. 2000) y estas proteínas actúan para especificar los dígitos. La identidad de los dígitos no es especificada directamente en cada uno de los primordios de los dígitos. En su lugar, la identidad de cada dígito es determinada por el mesodermo *interdigital*. En otras palabras, la identidad de cada dígito es especificada por las membranas interdigitales: la región de mesénquima que experimentará en breve apoptosis para liberar a cada dígito. El tejido interdigital especifica la identidad del dígito que se está formando anteriormente a ella (hacia el pulgar o el dedo mayor). Por lo tanto, cuando Dahn y Fallon (2000) extirparon las membranas interdigitales entre las condensaciones cartilaginosas que estaban formando los dígitos 2 y 3 de la extremidad posterior del pollo, el segundo dígito fue cambiado a una copia del dígito 1. Del mismo modo, cuando fue extirpada la membrana interdigital del dígito 3 sobre el otro lado, el tercer dígito formó una copia del dígito 2 (fig. 16-21A-C). Además, el valor posicional de la membrana interdigital puede ser alterado al cambiar los niveles de BMP en ésta. Cuando se colocaron bolitas que contenían antagonistas de BMP como Nogina en las membranas entre los dígitos 3 y 4, el dígito 3 se transformó anteriormente hacia dígito 2 (fig. 16-21D-F).

El segundo modo de funcionamiento de Sonic hedgehog es mediante la alteración de la proporción de Gli3 represor en relación con Gli3 activador. Como se recordará del capítulo 6, uno de los mecanismos de la señalización de Sonic hedgehog es evitar la proteólisis que producen las formas represoras de los grupos de factores de transcripción Gli/Ci. Cuando se evita esta proteólisis, las formas represoras de los factores de transcripción Gli/Ci son convertidas hacia formas activadoras. Experimentos recientes (Litingtung y col. 2002; te Welscher y col. 2002) han demostrado que los ratones homocigotas para las mutaciones de pérdida de función de *Gli3* (o *Gli3* y *Shh*) forman 6-11 dígitos por extremidad, ninguno de los cuales tiene una identidad normal (fig. 16-20G). Sin embargo las mutaciones de *shh* aisladas generan extremidades truncadas con pocos, si es que hay algún, dígito. Por lo tanto, Sonic hedgehog parece funcionar a través de Gli3 para especificar las identidades normales de los dígitos y para imponer la restringida pendactilia (cinco dígitos) sobre la extremidad. Hay una variación de 165 veces en la proporción de activador a represor Gli3 a través de la extremidad del ratón; esta proporción es más elevada en la región posterior. Parece que la forma represora de Gli3 es producida en todo el mesodermo, pero que Sonic hedgehog crea un gradiente tal que muy poco de activador es producido en la porción anterior del esbozo de la extremidad.

Sin embargo funciona, Sonic hedgehog (directa o indirectamente) regula la expresión de los genes Hoxd 5'. La transición desde los patrones de expresión de la fase I a la fase II (véase fig. 16-16) coincide con la expresión de *shh* en la ZAP. Además, el trasplante de la ZAP o de otras células que están secretando Sonic Hedgehog hacia el margen anterior del esbozo de la extremidad en este estadio lleva a la formación de patrones de expresión de genes Hoxd en imagen en espejo y da como resultado patrones de dígitos con imagen en espejo (Izpisúa-Belmonte y col. 1991; Nohno y col. 1991; Riddle y col. 1993).

Generación del eje dorsoventral

El tercer eje de la extremidad distingue la mitad dorsal de la extremidad (nudillos, uñas) de la mitad ventral (palmas, plantas). En 1974, MacCabe y col. demostraron que la polaridad dorsoventral del esbozo de la extremidad es determinada por el ectodermo que la recubre. Si se rota el ectodermo 180° con respecto al mesénquima del esbozo de la extremidad, el eje dorsoventral es invertido parcialmente; los elementos distales (dígitos) están "al revés." Esto sugirió que la especificación tardía del eje dorsoventral de la extremidad está regulada por su componente ectodérmico.

Una molécula que parece ser particularmente importante en la especificación de la polaridad dorsoventral es **Wnt7a**. El gen *Wnt7a* se expresa en el ectodermo dorsal (pero no en el ventral) de los esbozos de las extremidades del pollo y del ratón (Dealy 1993; Parr y col. 1993). En 1995, Parr y McMahon suprimieron genéticamente a Wnt7a de los embriones de ratón. Los embriones resultantes tenían plantas de los pies sobre ambas superficies de sus patas, lo que demuestra que Wnt7a es necesario para el establecimiento del patrón dorsal del miembro (fig. 16-22).

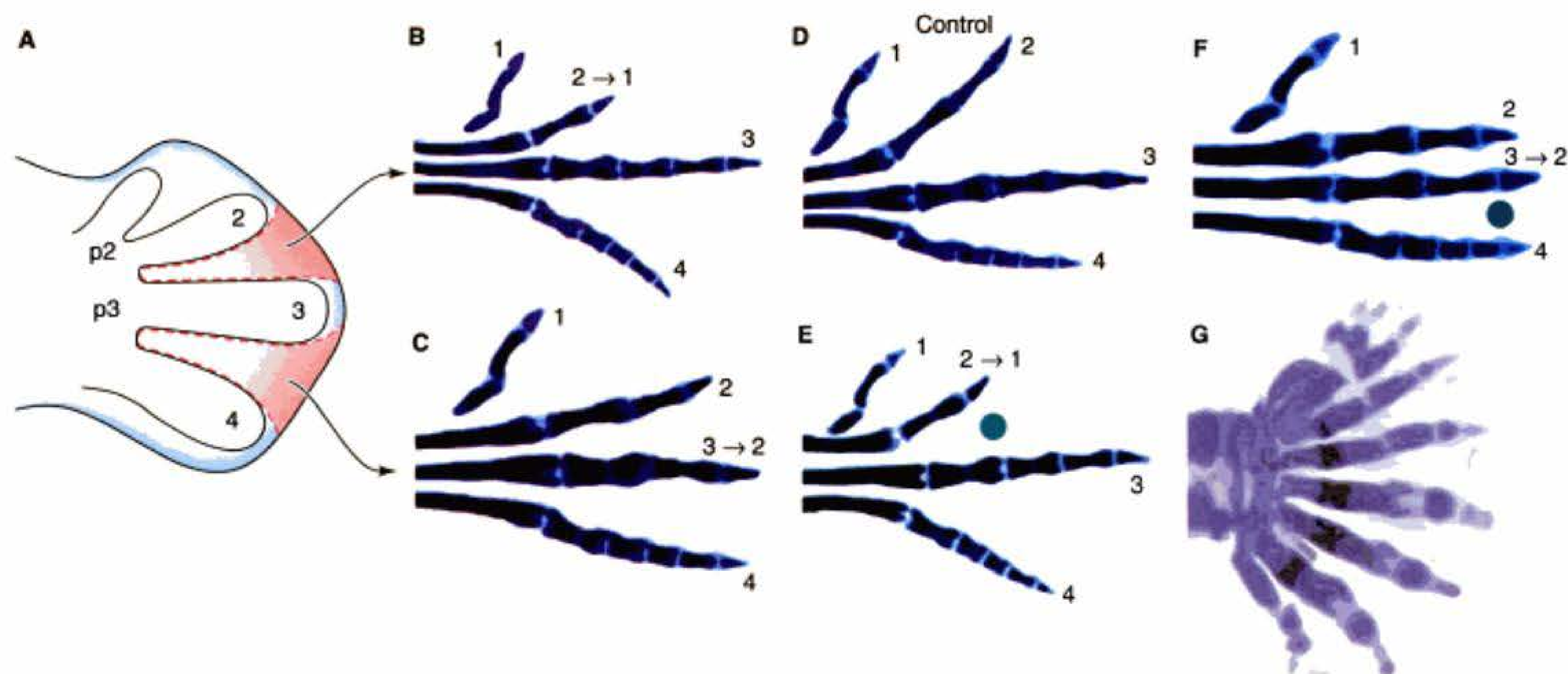


Fig. 16-21. Regulación de la identidad del dígito por concentraciones de BMP en el espacio interdigital anterior al dígito y por Gli3. **A.** Esquema para la extirpación de las regiones interdigitales (ID). Los resultados se muestran en **B** y **C**, respectivamente. **B.** La extirpación de la región interdigital 2 entre el primordio digital 2 (p2) y 3 (p3) hace que el dígito 2 cambie hacia la estructura de dígito 1. **C.** La extirpación de la región interdigital 3 (entre el primordio del dígito 3 y el del 4) hace que el dígito 3 forme las estructuras del dígito 2. **D.** Dígitos control y sus espacios interdigitales. **E**, **F.** Las mismas transformaciones como en **B** y **C** pueden obtenerse mediante el agregado de bolitas que contienen el inhibidor de BMP Nogina en la región interdigital. **E.** Cuando se coloca una bolita que contiene Nogina (puntos verdes) en la región interdigital 2, el segundo dígito es transformado en una copia de dígito 1. **F.** Cuando se coloca una bolita de Nogina en la región interdigital 3, el tercer dígito es transformado en una copia del dígito 2. **G.** La extremidad anterior de un ratón homocigota para las supresiones de *Gli3* y *shh* está caracterizada por dígitos extras de ningún tipo específico. (Según Dahn y Fallon 2000; Litingtung y col. 2002; fotografías cortesía de R. D. Dahn y J. F. Fallon.)

Wnt7a es el primero de los genes del eje dorsoventral que se expresa en el desarrollo de la extremidad. Éste induce la activación del gen *Lmx1* en el mesénquima dorsal. Este gen codifica un factor de transcripción que parece ser esencial para la especificación de los destinos celulares en la extremidad. Si la proteína Lmx1 se expresa en las células mesenquimáticas ventrales, aquellas células desarrollan un fenotipo dorsal (Riddle y col. 1995; Vogel y col. 1995; Altabef y Tickle 2002). Los mutantes de *Lmx1* en humanos y ratones también muestran su importancia para la especificación de los destinos dorsales de la extremidad. El knockout de este gen en ratones produce un síndrome en el que el fenotipo dorsal de la extremidad está ausente y en las mutaciones de pérdida de función en humanos produce el síndrome uña-rótula, una condición en la que los lados dorsales de las extremidades han sido ventralizados (es decir, sin uñas, sin rótulas) (Chen y col. 1998; Dreyer y col. 1998).

Coordinación de los tres ejes

Los tres ejes de la extremidad de los tetrápodos están interrelacionados y coordinados. Algunas de las principales interacciones entre los mecanismos que especifican los ejes se muestran en la figura 16-23. A su vez, las moléculas que definen uno de estos ejes son a menudo utilizadas para mantener otro eje. Por ejemplo, Sonic hedgehog en la ZAP activa la expresión del gen *fgf4* en la región posterior de la CAE (véase fig. 16-20). La expresión de la proteína FGF4 es importante en el reclutamiento de células mesenquimáticas hacia la zona de progreso y también es parcialmente responsable (junto con FGF8) del mantenimiento de la expresión de Sonic hedgehog en la ZAP (Li y Muneoka 1999). Sonic hedgehog de la ZAP luego mantiene a los FGF de la CAE mediante la inducción de Gremlin, un inhibidor de BMP que evita que BMP inhiba en el mesodermo a los FGF de la CAE (Zúñiga y col. 1999). Por esta razón, la CAE y la ZAP se apoyan mutuamente mediante un circuito de retroalimentación positiva de Sonic hedgehog y FGF (Todt y Fallon 1987; Laufer y col. 1994; Niswander y col. 1994).

Los ratones deficientes de *Wnt7a* descritos anteriormente no solo carecían de estructuras dorsales de la extremidad sino también de dígitos posteriores, lo que sugiere que Wnt7a también es necesario para el eje anteroposterior. Yang y Niswander (1995) hicieron un grupo de observaciones similares en los embriones de pollo. Estos investigadores extirparon el ectodermo dorsal de las extremidades en desarrollo y hallaron que tales operaciones resultaban en la pérdida de los elementos esqueléticos posteriores de las extremidades. La razón por la cual estas extremidades carecían de dígitos posteriores fue que la expresión de *shh* estaba muy reducida. La expresión viral inducida de *Wnt7a* fue capaz de reemplazar el ectodermo dorsal y restaurar la expresión de *shh* y los fenotipos posteriores. Estos hallazgos demostraron que la síntesis de Sonic hedgehog es estimulada por la combinación de las proteínas FGF4 y Wnt7a.

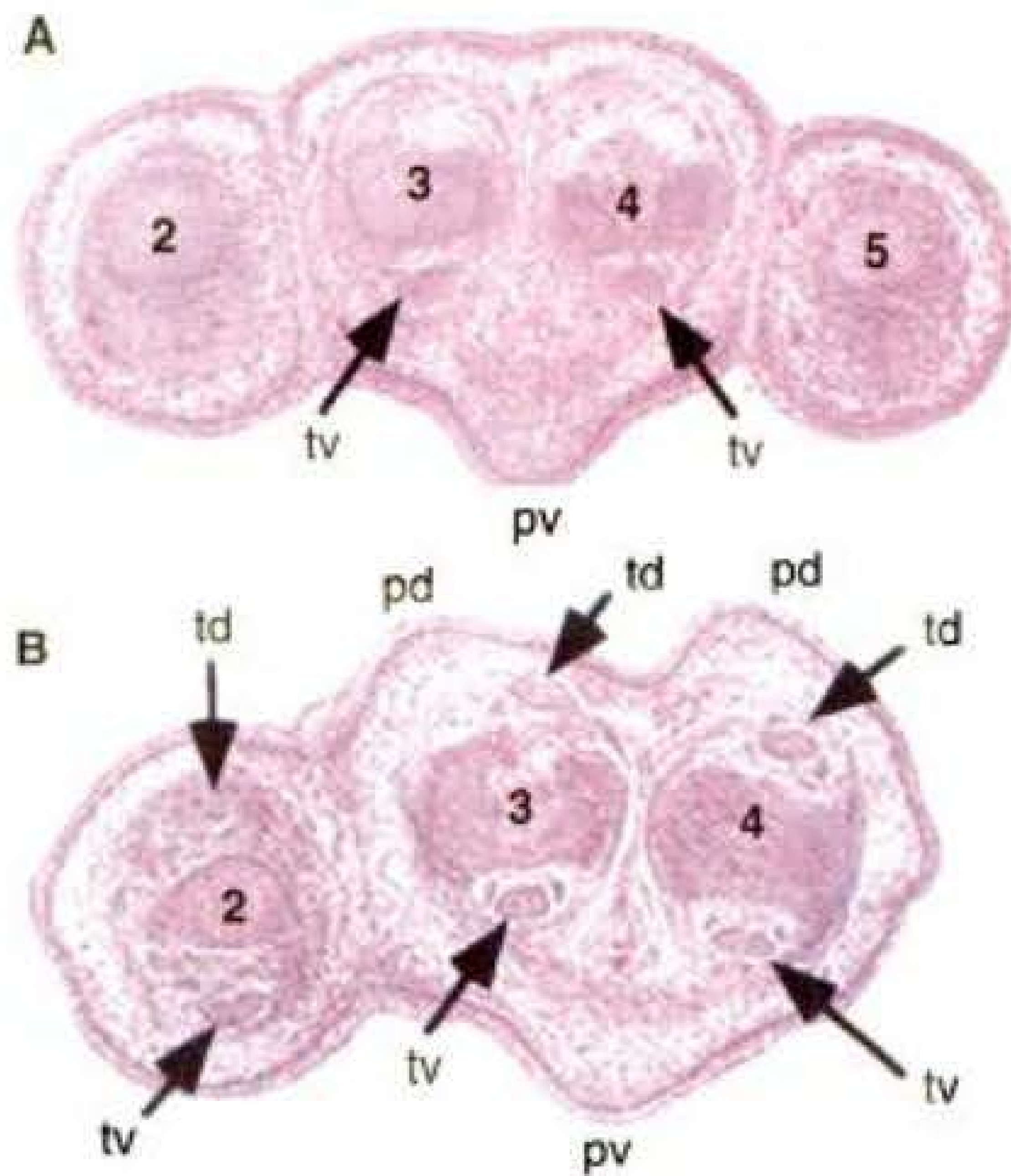


Fig. 16-22. Transformaciones de dorsal hacia ventral de las regiones de la extremidad en ratones deficientes para ambos genes de *Wnt7a*. **A.** Sección histológica (teñida con hematoxilina y eosina) de la pata de la extremidad anterior de un embrión de ratón tipo salvaje de 15,5 días. Se observan fácilmente los tendones ventrales y las plantas del pie ventrales. **B.** La misma sección a través de un embrión mutante deficiente en *Wnt7a*. Los tendones y las plantas del pie están duplicados sobre lo que normalmente debería ser la superficie dorsal de la pata. td, tendones dorsales; pd, planta del pie dorsal; pv, planta del pie ventral; tv, tendón ventral. Los números indican la identidad del dígito. (De Parr y McMahon 1995; fotografías cortesía de los autores.)

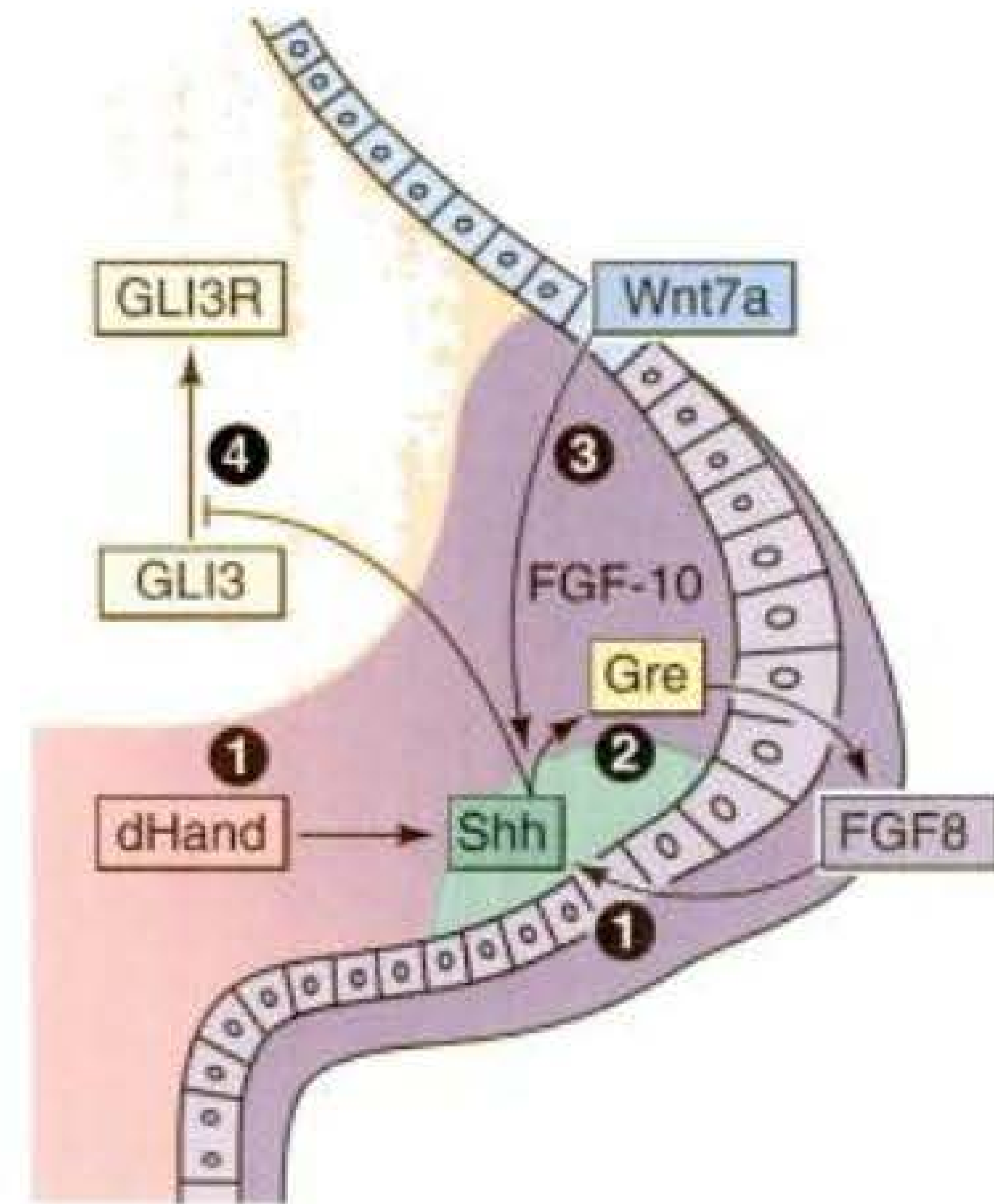


Fig. 16-23. Algunas de las interacciones moleculares por las que es iniciada y mantenida la formación y el crecimiento del esbozo de la extremidad. Algunos de los principales circuitos de retroalimentación incluyen 1) el establecimiento de la ZAP (Sonic hedgehog) por la CAE (FGF8) y dHAND; 2) la inducción de FGF (en la CAE) por Sonic hedgehog (en la ZAP) a través de la inducción de Gremlin por Shh, que bloquea a las BMP que podrían inhibir a los FGF; 3) el mantenimiento de Sonic Hedgehog por Wnt7a (en el ectodermo dorsal); 4) el bloqueo por Sonic Hedgehog de la segmentación de Gli3 hacia su forma de represor, crea un gradiente de Gli3 activador y Gli 3 represor. (Según Welscher 2002.)

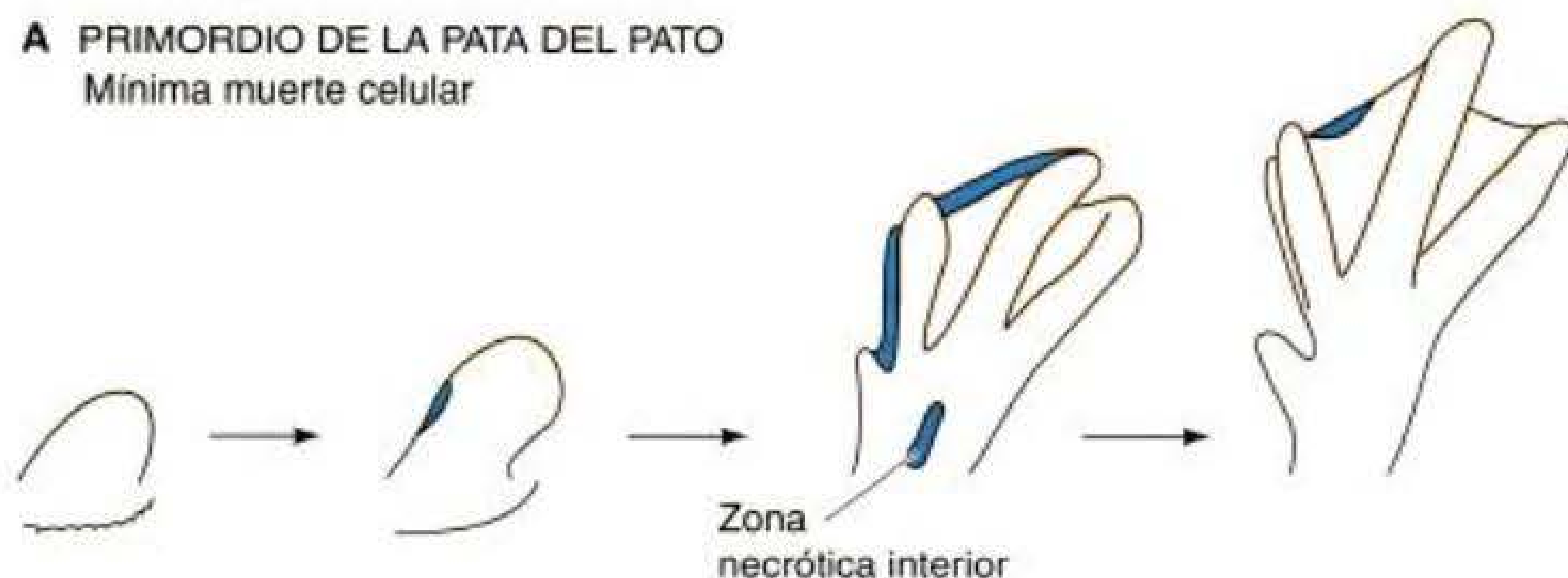
Esta coordinación de actividades es crítica en la regulación del crecimiento de la extremidad. (Imagine qué sucedería si la extremidad detuviese el crecimiento a lo largo de un eje pero continuara creciendo a lo largo de otros.) Parece qué las BMP son responsables de apagar la señal desde la CAE y de inhibir simultáneamente la señal de Wnt7a a lo largo del eje dorsoventral (Pizette y col. 2001). La señal de BMP elimina el crecimiento y el establecimiento del patrón a lo largo de los tres ejes. Cuando BMP exógeno se aplica a la CAE, el epitelio elongado de la CAE retorna a un epitelio cúbico y deja de producir FGF, y cuando BMP es inhibido por Nogina, la CAE continúa persistiendo días después de que hubiera retrocedido normalmente (Gañan y col. 1998; Pizette y Niswander 1999). El mecanismo por el cual la señal de BMP es regulada todavía no se entiende por completo, pero parece involucrar a la proteína antagonista de BMP Gremlin. Gremlin actúa contra BMP para preservar la CAE y la vía de Wnt7a (Merino y col. 1999).

Muerte celular y formación de los dígitos y las articulaciones

Escultura del autópodo

La muerte celular desempeña un papel en esculpir la extremidad. En efecto, ésta es esencial si nuestras cuatro articulaciones están formándose y si nuestros dedos están separándose (Zaleske 1985). La muerte (o la falta de muerte) de células específicas en la extremidad de los vertebrados está genéticamente programada y ha sido seleccionada a lo largo de la evolución. Uno de estos casos involucra el tener membrana interdigital de los pies o no tenerla. La diferencia entre una pata de pollo y la de un pato es la presencia de muerte celular entre los dígitos o ausencia de ella (fig. 16-24 A, B). Saunders y col. (1962; Saunders y Fallon 1966) han demostrado que después de una cierta edad, las células del pollo entre el cartílago del dígito están destinadas a morir y lo harán incluso si son trasplantadas a otra región del embrión o colocadas en cultivo. Sin embargo, antes de este momento, el trasplante a una extremidad de pato evitará su muerte celular. Entre el momento de determinación de la muerte celular y cuando realmente ésta tiene lugar, los niveles de síntesis de DNA, RNA y proteínas disminuyen de manera espectacular en la célula (Pollak y Fallon 1976).

Además de la **zona necrótica interdigital,** otras tres regiones del embrión son "esculpidas" por muerte celular. El cúbito y el radio son separados entre sí mediante una **zona necrótica interior**, y las otras dos regiones, la **necrótica anterior** y la **posterior**, forman aún más la extremidad del miembro (fig. 16-25B; Saunders y Fallon 1966). Aunque estas zonas son referidas como "necróticas," este término es un vestigio de los días en los que no había distinción entre la muerte celular necrótica y la muerte celular por apoptosis (véase cap. 6). Estas células mueren por apoptosis y la muerte del tejido interdigital está asociada a la fragmentación de su DNA (Mori y col. 1995).



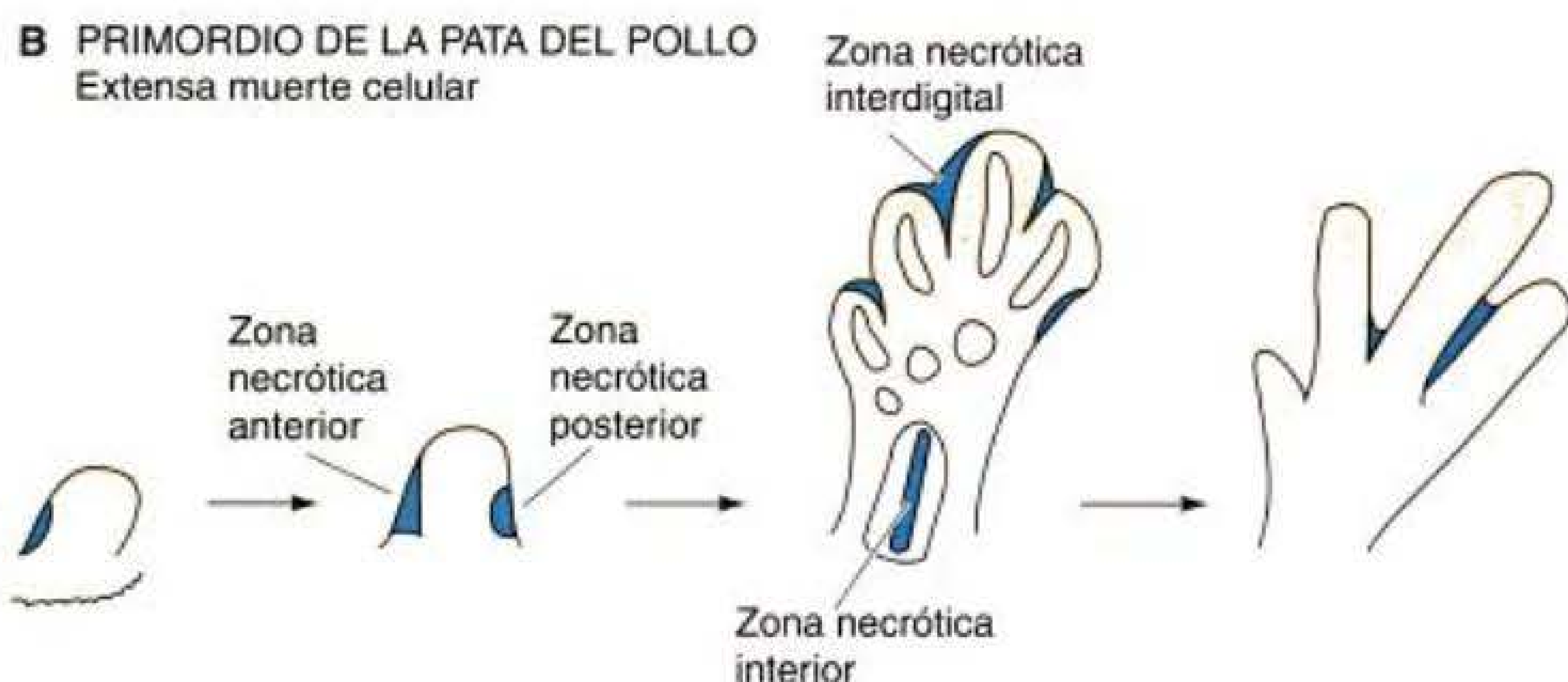


Fig. 16-24. Patrones de muerte celular en el primordio de la pata de un embrión, **A**, de pato y **B**, de pollo. El sombreado indica las áreas de muerte celular. En el pato, las regiones de muerte celular son muy pequeñas, mientras que hay extensas regiones de muerte celular en el tejido interdigital de la pata del pollo. (Según Saunders y Fallon 1966.)

La señal para apoptosis en el autópodo probablemente es proporcionada por las proteínas BMP. BMP2, BMP4 y BMP7 son expresadas en el mesénquima interdigital y el bloqueo de la señal de BMP (mediante la infección de las células de la zona de progreso con retrovirus que transportan receptores de BMP dominantes negativos) evita la apoptosis interdigital (Zou y Niswander 1996; Yokouchi y col. 1996). Debido a que estos BMP son expresados en todo el mesénquima de la zona de progreso, se piensa que la muerte celular debería ser el estado "por defecto" a menos que hubiese una supresión activa de las BMP. Esta supresión puede proceder de la proteína Nogina, que es producida en el cartílago en desarrollo de los dígitos y en las células pericondriales que lo rodean (Capdevila y Johnson 1998; Merino y col. 1998). Si se expresa Nogina en todo el esbozo de la extremidad, no se observa apoptosis.

La regulación de las BMP es crítica en la creación de las membranas interdigitales de las patas de los patos (Merino y col. 1999). Las regiones interdigitales de las patas del pato exhiben el mismo patrón de expresión de BMP que el de las membranas interdigitales de las patas del pollo. Sin embargo, mientras que las regiones interdigitales de las patas del pollo parecen experimentar apoptosis mediada por BMP, las patas del pato en desarrollo sintetizan la proteína Gremlin y bloquean esta muerte celular regional (véase fig. 23-22). Además, la membrana interdigital de la pata del pollo puede preservarse si se colocan bolitas embebidas en Gremlin en las regiones interdigitales (fig. 16-25).

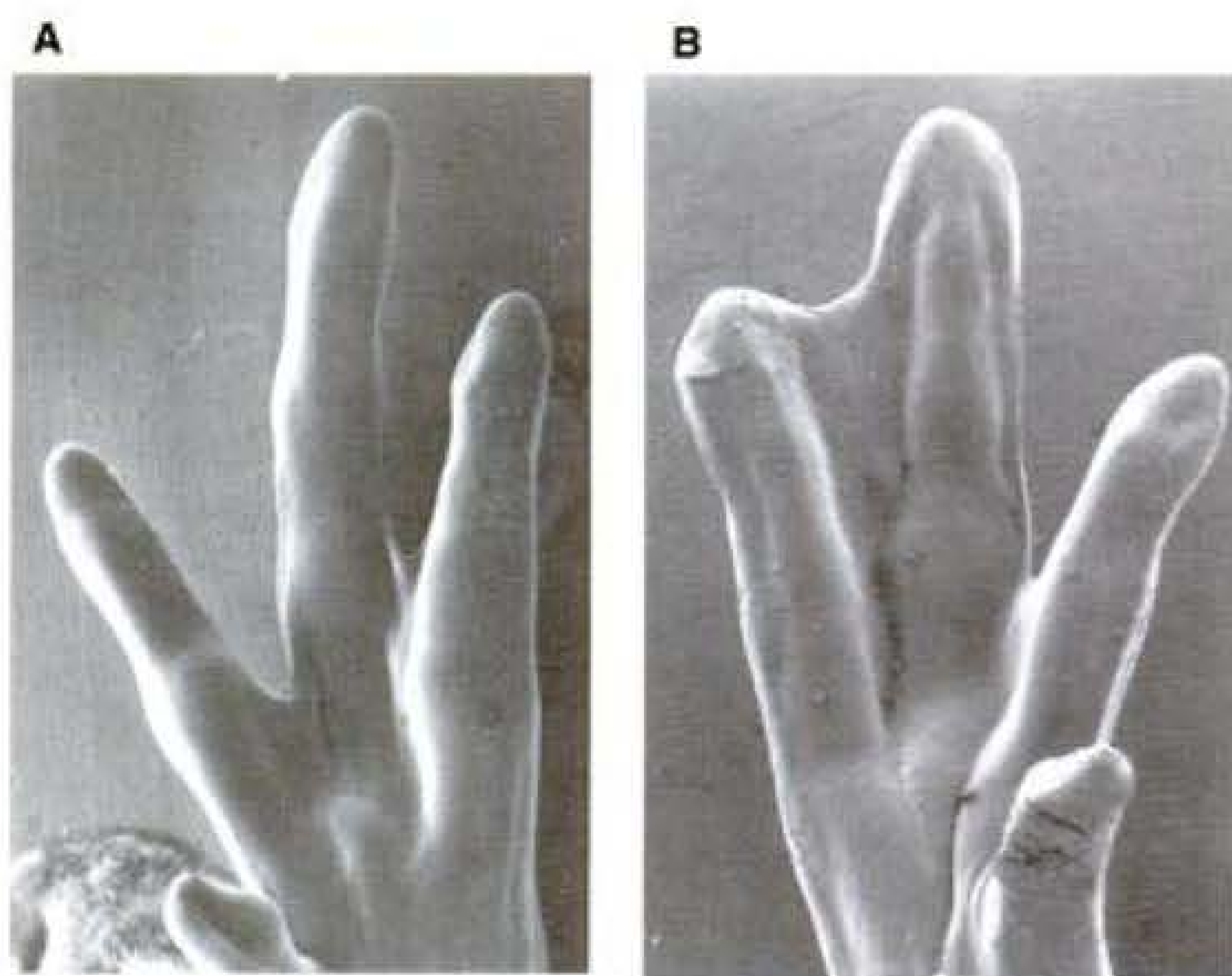


Fig. 16-25. Inhibición de la muerte celular mediante la inhibición de los BMP. **A.** Las extremidades de pollo control muestran extensa apoptosis en el espacio entre los dígitos, lo que lleva a la ausencia de membranas interdigitales. **B.** Sin embargo, cuando bolitas embebidas con la proteína Gremlin son colocadas en el mesodermo interdigital, la membrana interdigital persiste y genera un patrón parecido al del pato. (Según Merino y col. 1999; fotografías cortesía de E. Hurle.)

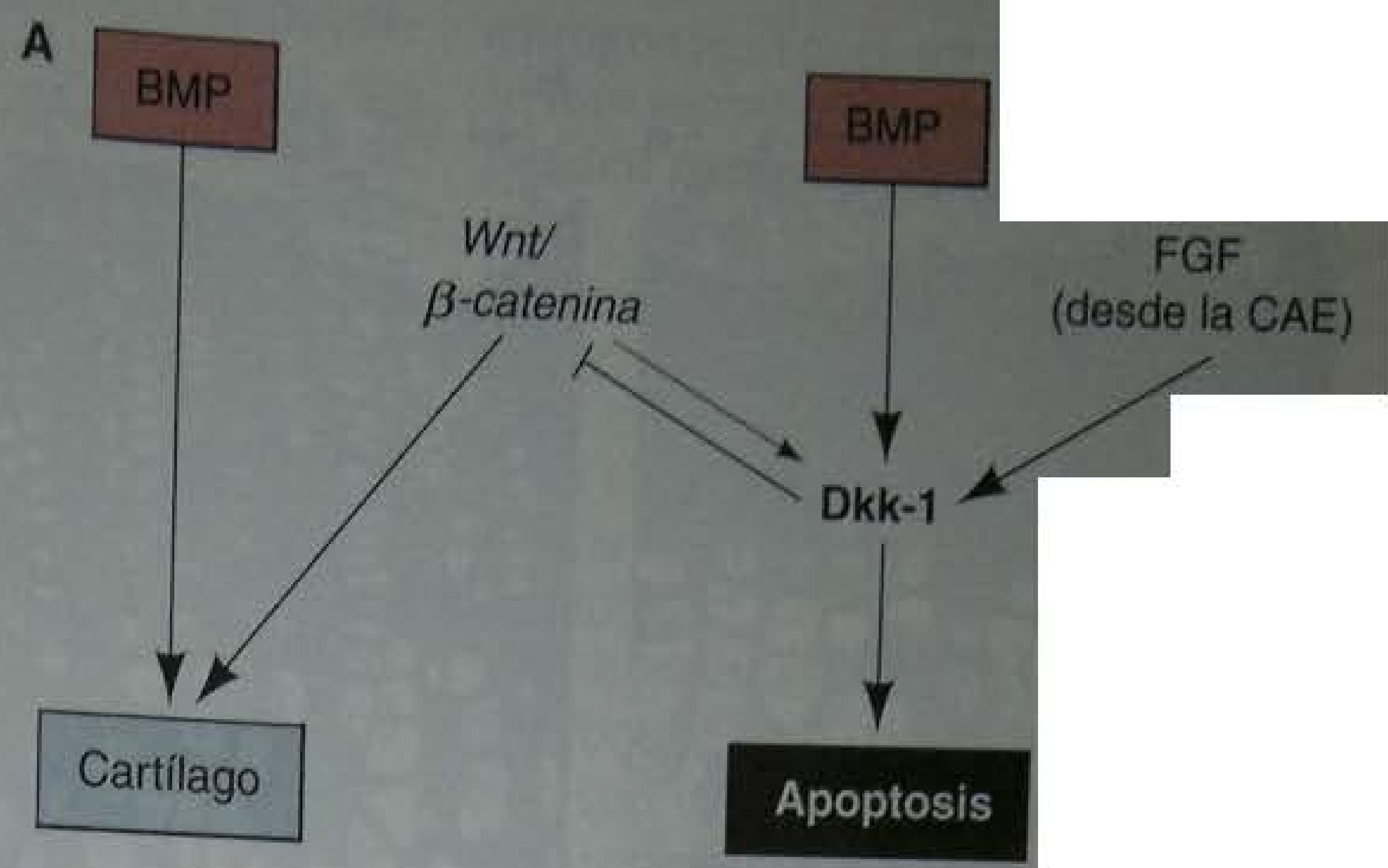
Formación de las articulaciones

La primera función adjudicada a las BMP fue la formación, no la destrucción, de tejido óseo y cartílago. En la extremidad en desarrollo, las BMP inducen a las células mesenquimáticas a experimentar apoptosis o a convertirse en cartílago –que produce condrocitos– según el estadio de desarrollo. Las mismas BMP pueden inducir muerte o diferenciación, dependiendo de la edad de la célula blanco de interés. Esta "dependencia de contexto" de la acción de la señal es un concepto crítico en biología del desarrollo. Ésta también es crítica para la formación de las articulaciones. Macias y colegas (1997) han demostrado que durante los estadios de esbozo de extremidad tempranos (antes de la condensación de cartílago), bolitas que secretan BMP2 o BMP7 provocan apoptosis.

Dos días más tarde, las mismas bolitas hacen que las células del esbozo de la extremidad formen cartílago.

En el desarrollo normal de la extremidad, las BMP utilizan ambas propiedades para formar articulaciones. BMP7 es producido en las células pericondriales que rodean a las condensaciones de condrocitos y promueve la formación de cartílago (fig. 16-26A; Macias y col. 1997). Otras dos proteínas BMP, BMP2 y GDF5, se expresan en las regiones entre los huesos, donde se formarán las articulaciones (fig. 16-28B; Macias y col. 1997; Brunet y col. 1998). Las mutaciones en ratón sugieren que la función de estas proteínas es crítica en la formación de la articulación. Las mutaciones de *Gdf5* producen braquipodia, una condición caracterizada por falta de articulaciones de la extremidad (Storm y Kingsley 1999). En ratones homocigotas para la pérdida de función de los alelos de *nogina*, tampoco se forman articulaciones. Parece que BMP7 en estos embriones defectuosos de *nogina* es capaz de reclutar a casi todo el mesénquima de alrededor hacia los dígitos (fig. 16-26C, D; Brunet y col. 1998).

Las proteínas Wnt y los vasos sanguíneos también parecen ser críticos en la formación de la articulación. La conversión de las células mesenquimáticas hacia nódulos de tejido formador de cartílago establece dónde estarán los límites del hueso. El mesénquima no formará tales nódulos ante la presencia de vasos sanguíneos y una de las primeras indicaciones de formación de cartílago es la regresión de los vasos sanguíneos en la región en la cual se formará el nódulo (Yin y Pacifici 2001). Las proteínas Wnt luego pueden iniciar los cambios en las moléculas de adhesión celular (como N-cadherina) que hacen que las células mesenquimáticas inicien la condrogénesis. La localización de estas moléculas puede determinar el número, la forma y el tamaño de las condensaciones (Hartmann y Tabin 2001; Tufan y Tuan 2001).



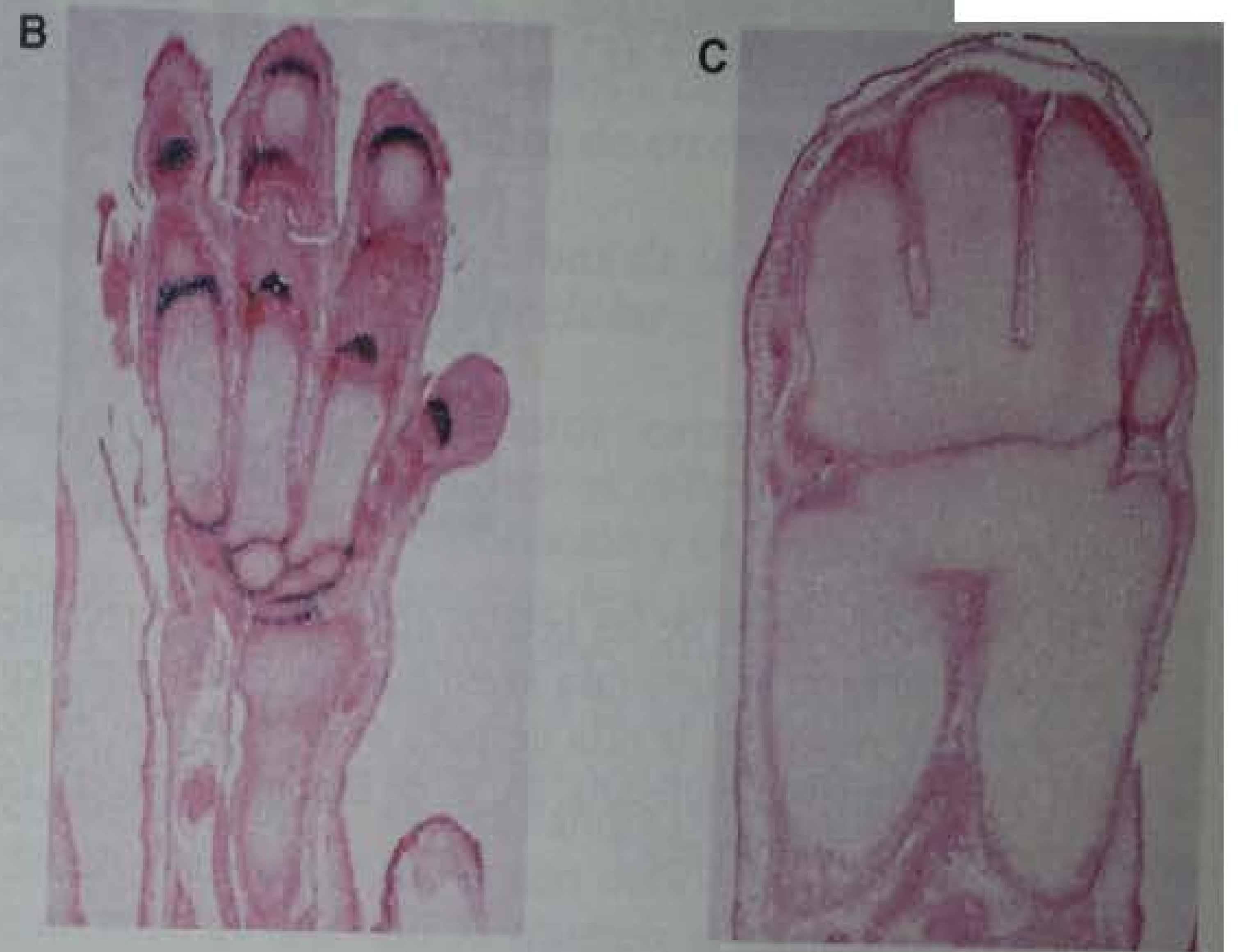


Fig. 16-26. Posible participación de las BMP en la estabilización del cartílago y en la apoptosis. **A.** Modelo para el papel doble de las señales de BMP en las células mesodérmicas de la extremidad. BMP puede ser recibido ante la presencia de FGF (para producir apoptosis) o Wnt (para inducir hueso). Cuando las FGF de la CAE están presentes, Dickkopf (DKK-1) es activado. Esta proteína media la apoptosis y al mismo tiempo inhibe a Wnt a colaborar en la formación del esqueleto. **B, C.** Los efectos de Nogina. **B.** Autópodo de 16,5 días de un embrión tipo salvaje, que muestra la expresión de GDF5 (azul oscuro) en las articulaciones. **C.** Autópodo de un ratón mutante de 16,5 días deficiente de *nogina*, que no muestra ninguna articulación ni la expresión de GDF5. Presumiblemente ante la ausencia de Nogina, BMP7 es capaz de convertir casi todo el mesénquima en cartílago. (A, según Gratevald y Rüther 2002; B, C, de Brunet y col. 1998, fotografías cortesía de A. P. McMahon.)

Crecimiento continuo de la extremidad: placas epifisarias

Si todo nuestro cartílago fuera convertido en hueso antes del nacimiento, no podríamos crecer a un mayor tamaño y nuestros huesos deberían ser solo tan largos como el molde cartilaginoso original. Sin embargo, a medida que los frentes de osificación se acercan a los extremos de los moldes de cartílago, los condrocitos cerca del frente de osificación proliferan previamente para experimentar hipertrofia, empujando al extremo cartilaginoso del hueso. En los huesos largos de muchos mamíferos (incluidos los seres humanos), la osificación endocondral se expande hacia fuera en ambas direcciones desde el centro del hueso (véase fig. 14-13). Estas áreas cartilaginosas en los extremos de los huesos largos son denominadas **placas de crecimiento epifisario.** Estas placas contienen tres regiones: una región de condrocitos en proliferación, una región de condrocitos maduros y una región de condrocitos hipertróficos (fig. 16-27; Chen y col. 1995). A medida que el cartílago interno se hipertrofia y el frente de osificación se extiende avanzando hacia fuera, el cartílago remanente en la placa de crecimiento epifisaria prolifera. El hueso continúa creciendo tanto como la placa de crecimiento epifisario sea capaz de producir condrocitos.

Mientras que muchos de los "ejecutores" de la formación del esbozo de la extremidad han sido identificados, todavía desconocemos cómo son llevadas a cabo las órdenes de estos factores paracrinos y de los factores de transcripción. Niswander (2002) escribió:

> *Hay un amplio hueco en nuestro entendimiento de cómo la actividad de los genes Shh, BMP, FGF y Wnt influye, por ejemplo, dónde se formarán las condensaciones cartilaginosas, cómo son esculpidos los elementos, cómo es especificado el número de elementos falángicos y dónde se insertará el músculo/tendón.*

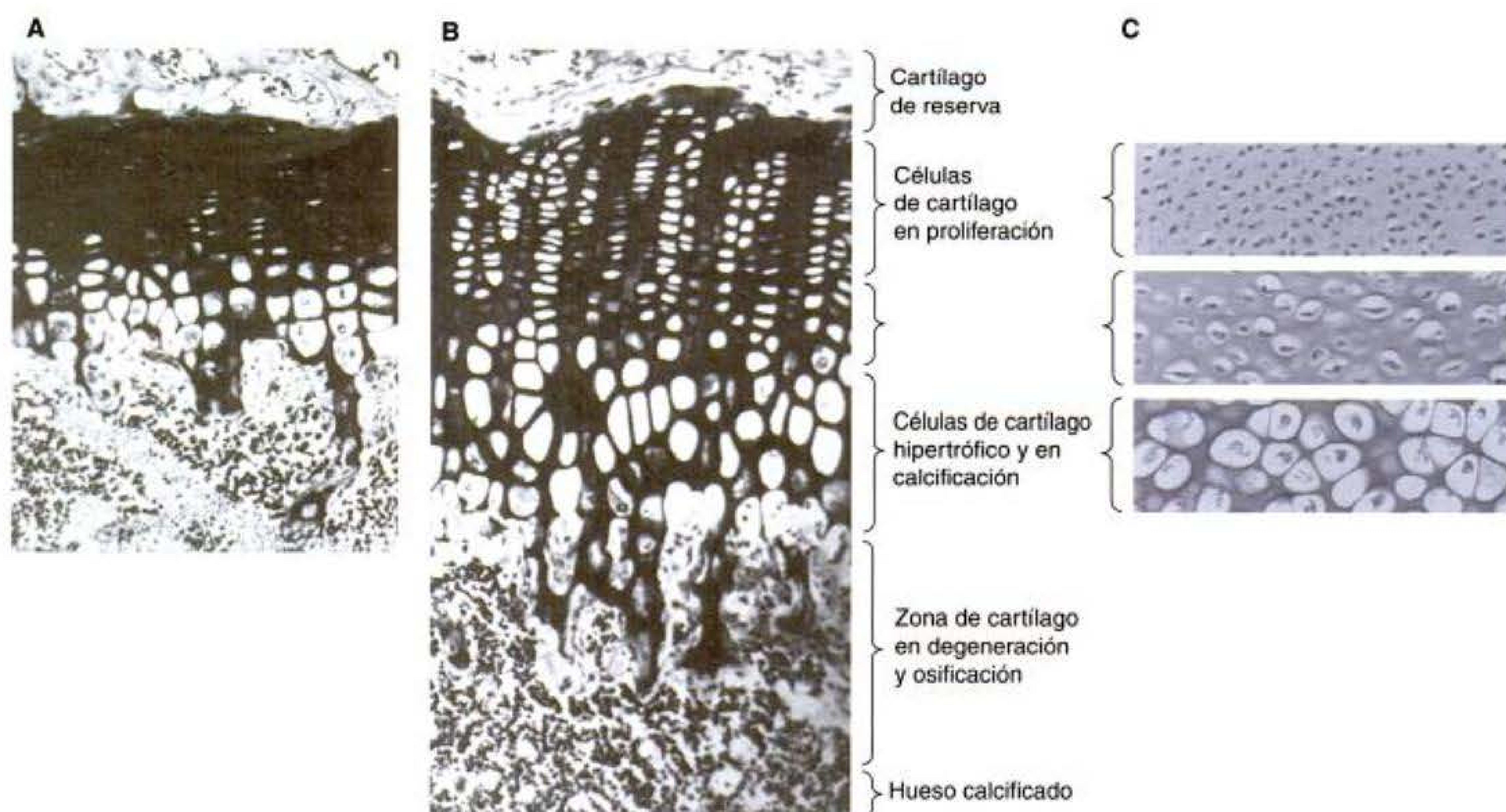


Fig. 16-27. Proliferación de las células en la placa de crecimiento epifisario en respuesta a la hormona de crecimiento. **A.** Placa de crecimiento epifisario en una rata joven que fue hecha deficiente en hormona de crecimiento mediante la extirpación de la hipófisis. **B.** La misma región en la rata después de la inyección de hormona de crecimiento. **C.** Cartílago teñido de regiones específicas de la placa de crecimiento epifisaria. (A, B, de Bloom y Fawcett 1975, microfotografías por I. Gersh; C, de Chen y col. 1995, microfotografía cortesía de P. Goetinck.)

El desarrollo de la extremidad es un lugar de encuentro emocionante para la biología del desarrollo, la biología evolutiva y la medicina. Dentro de la siguiente década, se debería esperar conocer las bases para numerosas enfermedades congénitas de la formación de la extremidad y quizás se entenderá cómo son modificadas las extremidades hacia aletas, alas, manos y patas.

Información adicional y especulaciones

Control de la maduración del cartílago en la placa de crecimiento

Descubrimientos recientes de mutaciones humanas y murinas que resultan en el desarrollo esquelético anormal han proporcionado una notable comprensión de cómo se regulan la diferenciación, la proliferación y el establecimiento del patrón de los condrocitos.

Receptores del factor de crecimiento fibroblástico

La proliferación de las células de la placa de crecimiento epifisaria y del cartílago facial puede ser interrumpida por la presencia de factores de crecimiento fibroblástico (Deng y col. 1996; Webster y Donoghue 1996). Estos factores parecen instruir a los precursores del cartílago a diferenciarse en lugar de dividirse. En los seres humanos, las mutaciones de los receptores para factores de crecimiento fibroblástico pueden hacer que estos receptores lleguen a ser activados prematuramente. Tales mutaciones dan origen a los principales tipos de enanismo. La acondroplasia es una condición dominante causada por mutaciones en la región de transmembrana del receptor tipo 3 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3; del inglés, *fibroblast growth factor receptor 3*). Casi el 95% de los enanismos acondroplásicos tienen la misma mutación de FGFR3, una sustitución de un par de bases, que convierte la glicina en arginina en la posición 380 en la región de transmembrana de la proteína. Además, las mutaciones en la porción extracelular de la proteína FGFR3 o en el dominio intracelular tirosina cinasa puede resultar en displasia tanatofórica, una forma letal de enanismo que se asemeja a la acondroplasia homocigótica (véase fig.

6-23; Bellus y col. 1995; Tavormina y col. 1995). Las mutaciones en FGFR1 pueden causar el síndrome de Pfeiffer, caracterizado por defectos en las extremidades y fusión prematura de las suturas craneales (craneosinostosis), que resulta en un cráneo y forma facial anormales. Diferentes mutaciones en FGFR2 pueden dar origen a varias anomalías de las extremidades y de la cara (Park y col. 1995; Wilkie y col. 1995).

Factores de crecimiento tipo insulina

Las células de la placa de crecimiento epifisaria son muy sensibles a las hormonas y su proliferación es estimulada por la hormona de crecimiento y los factores de crecimiento tipo insulina. Nilsson y col. (1986) demostraron que la hormona de crecimiento estimula la producción del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1; del inglés, *insulin-like growth factor I*) en los condrocitos epifisarios y que estos condrocitos responden a ésta mediante la proliferación. Cuando agregaron hormona de crecimiento a las placas de crecimiento tibiales de ratones jóvenes que no podían fabricar su propia hormona de crecimiento (debido a que sus hipófisis habían sido extirpadas), se estimulaba la formación de IGF-I en el condrocito de la zona proliferativa (véase fig. 14-16). La combinación de la hormona de crecimiento y de IGF-I parece proporcionar una señal mitótica extremadamente potente. Parece que IGF-I es esencial para el crecimiento acelerado normal en la pubertad. Los pigmeos de la selva de Ituri en Zaire tienen hormona de crecimiento y niveles de IGF-1 normales hasta la pubertad. Sin embargo, en la pubertad, sus niveles de IGF-1 caen hasta cerca de un tercio del de otros adolescentes (Merimee y col. 1987).

Receptores de estrógenos

El crecimiento acelerado de la pubertad y el posterior cese del crecimiento son inducidos por las hormonas sexuales (Kaplan y Grumbach 1990). Al final de la pubertad, altos niveles de estrógenos o de testosterona llevan a la placa de cartílago epifisaria remanente a experimentar hipertrofia. Estas células de cartílago crecen, mueren y son reemplazadas por hueso. Sin una posterior formación de cartílago, se detiene el crecimiento de estos huesos, un proceso conocido como **cierre de la placa de crecimiento.**

En condiciones de pubertad precoz, hay un crecimiento acelerado inicial (donde el individuo se hace más alto que sus pares), seguido por una detención de la división celular epifisaria (que permite que sus pares alcancen y superen su altura). En hombres, no se piensa que los estrógenos jueguen algún papel en estos acontecimientos. Sin embargo, en 1994, Smith y colegas publicaron la historia de un caso de un hombre cuyo crecimiento todavía era lineal a pesar de haber experimentado una pubertad normal. Sus placas epifisarias no habían madurado y a los 28 años de edad todavía tenía condrocitos en proliferación. Su "edad ósea" –la cantidad de cartílago epifisario que él retuvo– fue casi la mitad de su edad cronológica. Se halló que este hombre carecía de receptores funcionales de estrógenos. En el presente, al menos se han reportado tres hombres que no pueden producir estrógenos o que carecen del receptor de estrógeno. Los tres estaban próximos a los 2,18 metros y todavía crecían (Sharpe 1997). Estos casos demostraron que el estrógeno juega un papel en la maduración epifisaria en los hombres así como en las mujeres.

La hormona tiroidea y la hormona relacionada con la paratiroides también son importantes en la regulación de la maduración y del programa de hipertrofia de la placa de crecimiento epifisaria (Ballock y Reddi 1994). Por lo tanto, niños con hipotiroidismo son propensos a desarrollar alteraciones de la placa de crecimiento.

Proteínas de la matriz extracelular

La matriz extracelular del cartílago también es crítica para la adecuada diferenciación y organización de los condrocitos de la placa de crecimiento. Las mutaciones que afectan al colágeno tipo XI o la sulfatación de los proteoglucanos del cartílago pueden causar severas anomalías esqueléticas. Los ratones con deficiencias del colágeno tipo XI mueren al nacimiento con anomalías de la extremidad, de la mandíbula, de la costilla y del cartílago traqueal (Li y col. 1995). La falla en el agregado de los grupos sulfato a los proteoglucanos del cartílago causa displasia diastrófica, un enanismo humano caracterizado por una severa curvatura de la columna vertebral, pie zambo o equinovaro y lóbulos de la oreja deformados (Hästbacka y col. 1994).

Resumen: la extremidad del tetrápodo

1. Las posiciones donde surgen las extremidades desde el eje corporal dependen de la expresión de los genes Hox.
2. La especificación del esbozo de la extremidad como extremidad posterior o extremidad anterior es determinada por la expresión de Tbx4 y Tbx5.
3. El eje proximodistal de la extremidad en desarrollo es determinado por la inducción del ectodermo en el límite dorsoventral por un FGF (probablemente FGF10) desde el mesénquima. Esta inducción forma la cresta apical ectodérmica (CAE). La CAE secreta FGF8, que mantiene al mesénquima subyacente proliferativo y sin diferenciar. Esta región del mesénquima es denominada la zona de progreso.
4. A medida que la extremidad crece evaginándose, se forma primero el estilópodo, luego el zeugópodo y finalmente el autópodo. Cada fase del desarrollo del miembro está caracterizada por un patrón específico de expresión de genes Hox. La evolución del autópodo involucra la inversión de la expresión de los genes Hox que distinguen las aletas de los peces de las extremidades de los tetrápodos.
5. El eje anteroposterior es definido por la expresión de Sonic hedgehog en el mesodermo posterior del esbozo de la extremidad. Esta región es denominada la zona de actividad polarizante (ZAP). Si se coloca la ZAP o células secretoras de Sonic hedgehog o bolitas en el margen anterior del esbozo de la extremidad,

ellos establecen un segundo patrón de expresión de genes Hox con imagen en espejo y la correspondiente duplicación de lo dígitos con imagen en espejo.

6. La ZAP es establecida por la interacción de FGF desde la CAE con el mesénquima hecho competente a expresar Sonic hedgehog por su expresión de dHAND y genes Hox particulares. Sonic Hedgehog actúa, probablemente, de un modo indirecto, a través de los factores Gli, para cambiar la expresión de los genes Hox en el esbozo de la extremidad.
7. La identidad de cada dígito es especificada por la actividad de BMP en la región interdigital posterior a ésta y probablemente por el porcentaje de las formas activadora y represora de Gli3.
8. El eje dorsoventral se forma en parte por la expresión de Wnt7a en la porción dorsal del ectodermo de la extremidad. Wnt7a también mantiene el nivel de expresión de Sonic hedgehog en la ZAP y de FGF4 en la CAE posterior. FGF4 y Sonic hedgehog mantienen su expresión actuando recíprocamente entre sí.
9. La muerte celular en la extremidad es necesaria para la formación de los dígitos y de las articulaciones. Ésta está mediada por BMP. Las diferencias entre la pata del pollo sin membrana interdigital y la pata del pato con membrana interdigital pueden explicarse por las diferencias en la expresión de Gremlin, una proteína que antagoniza a las BMP.
10. Las BMP están involucradas en la inducción de apoptosis y en la diferenciación de las células mesenquimáticas hacia cartílago. Los efectos de las BMP pueden ser regulados por las proteínas Nogina y Gremlin.
11. Los extremos de los huesos largos humanos y de otros mamíferos contienen regiones cartilaginosas denominadas placas de crecimiento epifisarias. El cartílago en estas regiones prolifera de modo tal que el hueso crece en longitud. Finalmente, el cartílago es reemplazado por hueso y se detiene el crecimiento.

Bibliografía citada

Altabef, M. and C. Tickle. 2002. Initiation of dorso-ventral axis during chick limb development. Mech. Dev. 116: 19-27.

Ballock, R. T. and A. H. Reddi.1994. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. J. Cell. Biol. 126: 1311-1318.

Basson, C. T. and 13 others. 1996. Mutations in human TBXS cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. Nature Genet. 15: 30-35.

Bellus, G. A. and 8 others.1995. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. Nature Genet. 10: 357-359.

Brunet, L. J., J. A. McMahon, A. P. McMahon and R. M. Harland. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis and joint formation in the mammalian skeleton. Science 280: 1455-1457.

Bryant, S. V. and D. M. Gardiner. 1992. Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. Dev. Biol. 152: 1-25.

Burke, A. C., C. E. Nelson, B. A. Morgan and C. Tabin. 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. Development 121: 333-346.

Capdevila, J. and R. L. Johnson. 1998. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. Dev. Biol. 197: 205-217.

Capdevila, J., T. Tsukui, C. Rodriguez Esteban, V. Zappavigna and J. C. Izpisúa Belmonte. 1999. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. Mol. Cell 4: 839-849.

Carrington, J. L. and J. F. Fallon. 1988. Initial limb budding is independent of apical ectodermal ridge activity: Evidence from a limbless mutant. Development 104: 361-367.

Charité, J., W. de Graaff, S. Shen and J. Duchamps. 1994. Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplications of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. Cell 78: 559-601.

Charité, J., D. G. McFadden and E. N. Olsen. 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. Development 127: 2461-2470.

Chen, H. and 8 others. 1998. Limb and kidney defects in Lmxlb mutant mice suggest an involvement of LMXIB in human nail patella syndrome. Nature Genet. 19: 51-55.

Chen, Q., D. M. Johnson, D. R. Haudenschild and P. F. Goetinck. 1995. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: Cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. Dev. Biol. 172: 293-306.

Coates, M. I. 1994. The origin of vertebrate limbs. Development [Suppl.]: 169-180.

Cohn, M. J. and C. Tickle. 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. Nature 399: 474-479.

Crossley, P. H. and G. R. Martin. 1995. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. Development 121: 439-451.

Crossley, P. H., G. Monowada, C. A. MacArthur and G. R. Martin. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick development of the tetrapod limb. Cell 84: 127-136.

Dahn, R. D. and J. F. Fallon. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulating BMP signaling. Science 289: 438-441.

Davis, A. P., D. P. Witte, H. M. Hsieh-Li, S. Potter and M. R. Capecchi. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11. Nature 375: 791-795.

Dealy, C. N., A. Roth, D. Ferrari, A. M. C. Brown and R. A. Kosher. 1993. Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner that suggests roles in pattern formation along

TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. Nature Genet. 15: 21 -29.

Li, S. and K. Muneoka. 1999. Cell migration and chick limb development: Chemotactic action of FGF-4 and the AER. Dev. Biol. 211: 335-347.

Li, Y. and 16 others. 1995. A fibrillar collagen gene, Colllal, is essential for skeletal morphogenesis. Cell 80: 423-430.

Litingtung, Y., R. D. Dahn, Y. Li, J. F. Fallon and C. Chiang. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. Nature 418: 979-983.

Logan, M., H.-H. Simon and C. Tabin. 1998. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. Development 125: 2825-2835.

López-Martínez, A. and 7 others. 1995. Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of sonic hedgehog cleavage. Curr. Biol. 5: 791-796.

MacCabe, J. A., J. Errick and J. W. Saunders, Jr. 1974. Ectodermal control of dorso-ventral axis in leg bud of chick embryo. Dev. Biol. 39: 69-82.

Macias, D., Y. Gañon, T. K. Sampath, M. E. Piedra, M. A. Ros and J. M. Hurle. 1997. Role of BMP2 and OP-1 (BMP7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. Development 124: 1109-1117.

Maden, M. 1993. The homeotic transformation of tails into limbs in Rana temporaria by retinoids. Dev. Biol. 159: 379-391.

Mahmood, R. and 9 others. 1995. A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb outgrowth. Curr. Biol. 5: 797-806.

Mercader, N., E. Leonardo, N. Azpiazu, A. Serrano, G. Morata, C. Martinez and M. Torres.1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meisl/Hth. Nature 402: 425-429.

Mercader, N., E. Leonardo, M. E. Piedra, C. Martinez, M. A. Ros and M. Torres. 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. Development 127: 3961-3970.

Merimee, T. J., J. Zapf, B. Hewlett and L. L. Cavalli-Sforza. 1987. Insulin-like growth factors in pygmies: The role of puberty in determining final stature. N. Engl. J. Med. 316: 906-911.

Merino, R., Y. Gañan, D. Macias, A. N. Economides, K. T. Sampath and J. M. Hurle. 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFβs, and noggin through BMP signaling. Dev. Biol. 200: 355.

Merino, R, J. Rodriguez-Leon, D. Macias, Y. Gañan, A. N. Economides and J. M. Hurle. 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. Development 126: 5515-5522.

Mohanty-Hejmadi, P., S. K. Dutta and P. Mahapatra. 1992. Limbs generated at the site of tail amputation in marbled balloon frog after vitamin A treatment. Nature 355: 352-353.

Molven, A., C. V. E. Wright, R. Bremiller, E. M. De Robertis and C. B. Kimmel. 1990. Expression of a homeobox gene product in normal and mutant zebrafish embryos: Evolution of the tetrapod body plan. Development 109: 279-288.

Morgan, B. A. and C. Tabin. 1994. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. Development [Suppl.]: 181-186.

Mori, C., N. Nakamura, S. Kimura, H. Irie, T. Takigawa and K. Shiota. 1995. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. Anat. Rec. 242: 103-110.

Mortlock, D. P. and J. W. Innis. 1997. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. Nature Genet. 15: 179-181.

Muchmore, W. B. 1957. Differentiation of the trunk mesoderm in Ambystoma maculatum. J. Exp. Zool. 134: 293-314.

Müller, G., J. Streicher and R. Müller 1996. Homeotic duplicate of the pelvic body segment in regenerating tadpole tails induced by retinoic acid. Dev. Genes Evol. 206: 344-348.

Muneoka, K. and S. V. Bryant. 1982. Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. Nature 298: 369-371.

Muragaki, Y., S. Mundlos, J. Upton and B. Olsen. 1996. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. Science 272: 548-551.

Nelson, C. E. and 9 others. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. Development 122: 1449-1466.

Newman, S. A. 1996. Sticky fingers: Hox genes and cell adhesion in vertebrate development of the tetrapod limb. BioEssays 18: 171-174.

Nilsson, A., J. Isgaard, A. Lindahl, A. Dahlstrom, A. Skottner and O. G. P. Isaksson. 1986. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. Science 233: 571-574.

Niswander, L. 2002. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. Int. J. Dev. Biol. 46: 877-881.

Niswander, L., S. Ieffrey, G. R. Martin and C. Tickle. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. Nature 371: 609-612.

Nohno, T. and 7 others. 1991. Involvement of the Chox-4 chicken homeobox genes in determination of anteroposterior axial polarity during development of the tetrapod limb. Cell 64: 1197-1205.

Ohuchi, H. and S. Noji. 1999. Fibroblast growth factor-induced additional limbs in the study of initiation of limb formation, limb identity, myogenesis, and innervation. Cell Tissue Res. 296: 45-56.

Ohuchi, H. and 11 others. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, and apical ectodermal factor. Development 124: 2235-2244.

Ohuchi, H. and 7 others. 1998. Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick TbxS and Tbx4. Development 125: 51-60.

Oliver, G., C. V. E. Wright, J. Hardwicke and E. M. De Robertis. 1988. A gradient of homeodomain protein in developing forelimbs of Xenopus and mouse embryos. Cell 55:1017-1024.

Owen, R. 1849. On the Nature of Limbs. J. Van Voor, London.

Parr, B. A. and A. P. McMahon. 1995. Dorsalizing signal wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of the mouse limb. Nature 374: 350-353.

Parr, B. A., M. J. Shea, G. Vassileva and A. P. McMahon. 1993. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in early embryonic CNS and limb buds. Development 119: 247-261.

Phillips, J. 1991. Higgledy, piggledy. N. Engl. J. Med. 324: 497.

Pizette, S. and L. Niswander. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. Development 126: 883-894.

Pizette S., C. Abate-Shen and L. Niswander. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. Development 128: 4463-4474.

Pollak, R. D. and J. F. Fallon. 1976. Autoradiographic analysis of macromolecular synthesis in prospectively necrotic cells of the chick limb bud. II. Nucleic acids. Exp. Cell Res. 100: 15-22.

Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer and C. Tabin. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell 75: 1401-1416.

Riddle, R. D., M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T. M. lessell and C. Tabin.1995. Induction of the LIM homeobox gene Lmxl by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. Cell 83: 631-640.

Rodriguez-Esteban, C., I- W. R. Schwabe, J. De La Peña, B. Foys, B. Eshelman and J. C. Izpisúa-Belmonte. 1997. Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. Nature 386: 360-366.

Rodriguez-Esteban, C., T. Tsukui, S. Yonei, J. Magallon, K. Tamura and J. C. Izpisúa-Belmonte. 1999. T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. Nature 398: 814-818.

Rosenquist, G. C. 1971. The origin and movement of the limb-bud epithelium and mesenchyme in the chick embryo as determined by radioautographic mapping. J. Embryol. Exp. Morphol. 25: 85-96.

Rowe, D. A. and J. F. Fallon. 1982. The effect of removing posterior apical ectodermal ridge of the chick wing and leg on pattern formation. J. Embryol. Exp. Morphol. 65 [Suppl.]: 309-325.

Rowe, D. A., J. M. Cairnes and J. F. Fallon. 1982. Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. Dev. Biol. 93: 83-91.

Rubin, L. and J. W. Saunders, Jr. 1972. Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limbs in the chick embryo: Constancy and temporal limits of the ectodermal induction. Dev. Biol. 28:94-112.

Saito, D., S. Yonei-Tamura, K. Kano, H. Ide and K. Tamura. 2002. Specification and determination of limb identity: Evidence for inhibitory regulation of Tbx gene expression. Development 129: 211-220.

Saunders, J. W., Jr. 1948. The proximal-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool. 108: 363-404.

Saunders, J. W., JL 1972. Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. Ann. NYAcad. Sci. USA 193: 292.

Saunders, J. W., Jr. and J- F. Fallon. 1966. Cell death in morphogenesis. In M. Locke (ed.), Major Problen of Developmental Biology. Academic Press, New-York, pp. 289-314.

Saunders, I. W., lr. and M. T. Gasseling. 1968. Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. In R. Fleischmajer and R. E. Billingham (eds.), Epithelial-Mesenchymal Interactions. Williams & Wllkins, Baltimore, pp. 78-97.

Saunders, I. W., Ir. and C. Reuss. 1974. Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo. Dev. Biol. 38: 41-50.

Saunders, J. W., Ir, I- M. Cairns and M. T. Gasseling. 1957. The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts of the chick. J. Morphol. 101: 57-88.

Saunders, J. W., Jr., M. T. Gasseling and L. C. Saunders. 1962. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. De. Biol. 5: 147-178.

Sekine, K. and 10 others. 1999. Fgf10 is essential for limb and lung formation. Nature Genet. 21: 138-141.

Sessions, S. and S. B. Ruth. 1990. Explanatión for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. J. Exp. Zool. 254: 38-47.

Sessions, S. K., D. M. Gardiner and S. V. Bryant. 1989. Compatible limb patterning mechanisms in urodeles and anurans. Dev. Biol. 131: 294-301.

Sessions, S. K., R. A. Franssen and V. C. Horner. 1999. Morphological clues from multilegged frogs: Are retinoids to blame? Science 284: 800-802.

Sharpe, R. M. 1997. Do males rely on female hormones? Nature 390: 447-448.

Shubin, N. H. and P. Alberch. 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. Evol. Biol. 20: 319-387.

Shubin, N., C. Tabin and S. Carroll. 1997. Fossils, genes, and the evolution of animal limbs. Nature 388: 639-648.

Smith, D. M., R. D. Torres and T. D. Stephens. 1996. Mesonephros has a role in limb development and is related to thalidomide embryopathy. Teratology 54: 126-134.

Smith, E. P. and 8 others.1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N. Engl. J. Med. 331: 1056-1061.

Sordino, P., F. van der Hoeven and D. Duboule. 1995. Hox gene expression in teleost fins and the origin of the vertebrate digits. Nature 375: 678-681.

Stephens, T. D. and T. R McNulty. 1981. Evidence for a metameric pattern in the development of the chick humerus. J. Embryol. Exp. Morphol. 61: 191-205

Stocum, D. L. and J. F. Fallon. 1982. Control of pattern formation in urodele limb ontogeny: A review and hypothesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 69: 7-36.

Storm, E. E. and D. M. Kingsley. 1999. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. Dev. Biol. 209: 11-27.

Stratford, T., C. Horton and M. Maden. 1996. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. Curr Biol. 6: 1124-1133.

Summerbell, D. 1974. A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb bud. J. Embryol. Exp. Morphol. 32: 651-660.

Summerbell, D. and J. H. Lewis. 1975. Time, place and positional value in the chick limb bud. J. Embryol. Exp. Morphol. 33: 621-643.

Sun, X., F. V. Mariani and G. M. Martin. 2002. Functions of FGF signaling from the apical ectodermal ridge in limb development. Nature. In press.

Takeuchi, J. K. and 8 others. 1999. Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. Nature 398: 810-814.

Tanaka, M., K. Tamura, S. Noji, T. Nohno and H. Ide. 1997. Induction of additional limb at the dorsal-ventral boundary of a chick embryo. Dev. Biol. 182: 191-203.

Tavormina, P. L. and 9 others. 1995. Thanatophoric dysplasia (types I and II) cau-

sed by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. Nature Genet. 9: 321-328.

te Welscher, P., A. Zuniga, S. Kuijper, T. Drenth, H. J. Goedemans, F. Meijlink and R. Zeller.2002. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GL13. Science 298: 827-830.

Tickie, C., D. Summerbell and L. Wolpert. 1975. Positional signaling and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature 254: 199-202.

Todt, W. L. and J. F. Fallon. 1987. Posterior apical ectodermal ridge removal in chick wing bud triggers a series of events resulting in defective anterior pattern. Development 101: 505-515.

Tufan, A. C. and R. S. Tuan. 2001. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. FASEB J. 15: 1436-1438.

van der Hoeven, F., J. Zakay and D. Duboule. 1996. Gene transpositions in the HoxD complex reveal a hierarchy of regulatory controls. Cell 85: 1025-1035.

Vogel, A., C. Rodriguez, W. Warnken and J.-C. Izpisúa-Belmonte. 1995. Dorsal cell fate specified by chick Lmxl during vertebrate development of the tetrapod limb. Nature 378: 716-720.

Vogel, A., C. Rodriguez and J.-C. Izpisúa-Belmonte. 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth, and patterning of the vertebrate limb. Development 122: 1737-1750.

Webster, M. K. and D. J. Donoghue. 1996. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. MBO J. 15: 520-527.

Wessells, N. K. 1977. Tissue Interaction and Development. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA

Wolpert, L., C. Tickle and M. Sampford. 1979. The effect of cell killing by x-irradiation on pattern formation in the chick limb. J. Embryol. Exp. Morphol. 50: 175-193.

Xu, X. L. and 7 others. 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulatory loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. Development 125: 753-765.

Yang, Y. Z. and L. Niswander. 1995. Interaction between signaling molecules Wnt7a and Shh during vertebrate limb development: Dorsal signals regulate anteroposterior patterning. Cell 80: 939-947.

Yang, Y. Z. and 10 others. 1997. Relationship between dose, distance, and time in Sonic hedge-hog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. Development 124: 4393-4404.

Yin, M. and M. Pacifici. 2001. Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. Dev. Dynam. 222: 522-533.

Yokouchi, Y., S. Nakazato, M. Yamamoto, Y. Goto, T. Kameda, H. Iba and A. Kuroiwa. 1995. Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes in adhesiveness in chick limb buds. Genes Dev. 9: 2509-2522.

Yokouchi, Y., J. Sakiyama, T. Kameda, H. Iba, A. Suzuki, N. Ueno and A. Kuroiwa.1996. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. Development 122: 3725-3734.

Yonei-Tamura, S., T. Endo, H. Yajima, H. Ohuichi, H. Ida and K. Tamura. 1999. FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. Dev. Biol. 211: 133-143.

Zaleske, D. J. 1985. Development of the upper limb. Hand Clin. 1985(3): 383-390.

Zou, H. and L. Niswander. 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosi0s and scaie formation. Science 272: 738-741.

Zúñiga, A., A. P. Haramis, A. P. McMahon and R. Zeller. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. Nature 401: 598-602.

Zwiiling, E. 1955. Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud. J. Exp. Zool. 128: 423-441.

Capítulo 17 Determinación del sexo

La reproducción sexual es... la obra maestra de la naturaleza.
ERASMUS DARWIN (1791)

Es curioso advertir que el número de especulaciones relacionadas con la naturaleza del sexo casi se ha duplicado desde que Drelincourt, en el siglo XVIII, reuniera doscientos sesenta y dos " hipótesis infundadas," y desde que cáusticamente Blumenbach comentara que ninguna era más cierta que la propia teoría de Drelincourt que constituyó la número doscientos sesenta y tres.
J. A. THOMSON (1926)

CÓMO SE DETERMINA EL SEXO DE UN INDIVIDUO ha sido una de las grandes preguntas de la embriología desde la antigüedad. Aristóteles, quien recogió y diseccionó embriones, afirmó que el sexo era determinado por el calor del progenitor masculino durante el coito (Aristóteles, alrededor del 350 a.C.). Mientras más calurosa fuese la pasión, mayor era la probabilidad de tener descendencia masculina; por lo tanto, aconsejaba a los hombres de avanzada edad a concebir en verano si deseaban tener herederos masculinos.

Aristóteles promulgó una hipótesis simple sobre la determinación del sexo: las mujeres eran hombres cuyo desarrollo se detuvo demasiado temprano. Estas mujeres eran "un hombre mutilado" cuyo desarrollo se había detenido debido al frío del útero materno que se apoderó del calor del semen del padre. Las mujeres eran, por esta razón, más frías y pasivas que los hombres, y los órganos sexuales femeninos no estaban maduros hasta el punto de no poder proporcionar semillas activas. Esta visión fue aceptada por la Iglesia Cristiana y por el médico grecorromano Galeno* (cuyos textos de anatomía fueron el estándar por cerca de mil años). Alrededor del año 190 Galeno escribió:

> *Así como la especie humana es la más perfecta de todos los animales, también dentro de la especie humana, el hombre es más perfecto que la mujer y la razón de esta perfección es el exceso de calor, porque el calor es el instrumento primario de la naturaleza... la mujer es menos perfecta que el hombre en relación con las partes generativas. Para las partes que fueron formadas dentro de ella cuando todavía era un feto, pero no podría el defecto del calor emerger y proyectarse sobre el exterior.*

La opinión de que la mujer fuese un hombre pobremente desarrollado y de que sus genitales fuesen como los de los hombres, puestos desde dentro hacia afuera, fue muy popular durante cerca de mil años. Tan tarde como en 1543, Andreas Vesalius, el anatomista de Padua que anuló la mayor parte de la anatomía de Galeno (y quien se puso en peligro ante la censura de la iglesia por sostener que el hombre y la mujer tenían el mismo número de costillas), mantuvo este punto de vista. Las ilustraciones de sus dos trabajos principales, *De Humani Corporis Fabrica and Tabulae Sex*, muestran que él vio a los genitales femeninos como representaciones internas de los genitales masculinos (fig. 17-1). Sin embargo, el libro de Vesalius desencadenó una revolución en la anatomía y hacia el final de 1500 los anatomistas habían desestimado las representaciones de Galeno de la anatomía femenina. Durante el siglo XV y el XVI, las mujeres fueron vistas como productoras de huevos

* Griego de nacimiento, Galeno primero adquirió fama como médico de los gladiadores, de cuyos cadáveres indudablemente aprendió gran parte de su anatomía. Viajó a Roma, donde llegó a ser el médico personal del emperador Marco Aurelio y de su hijo y sucesor, Comodo.

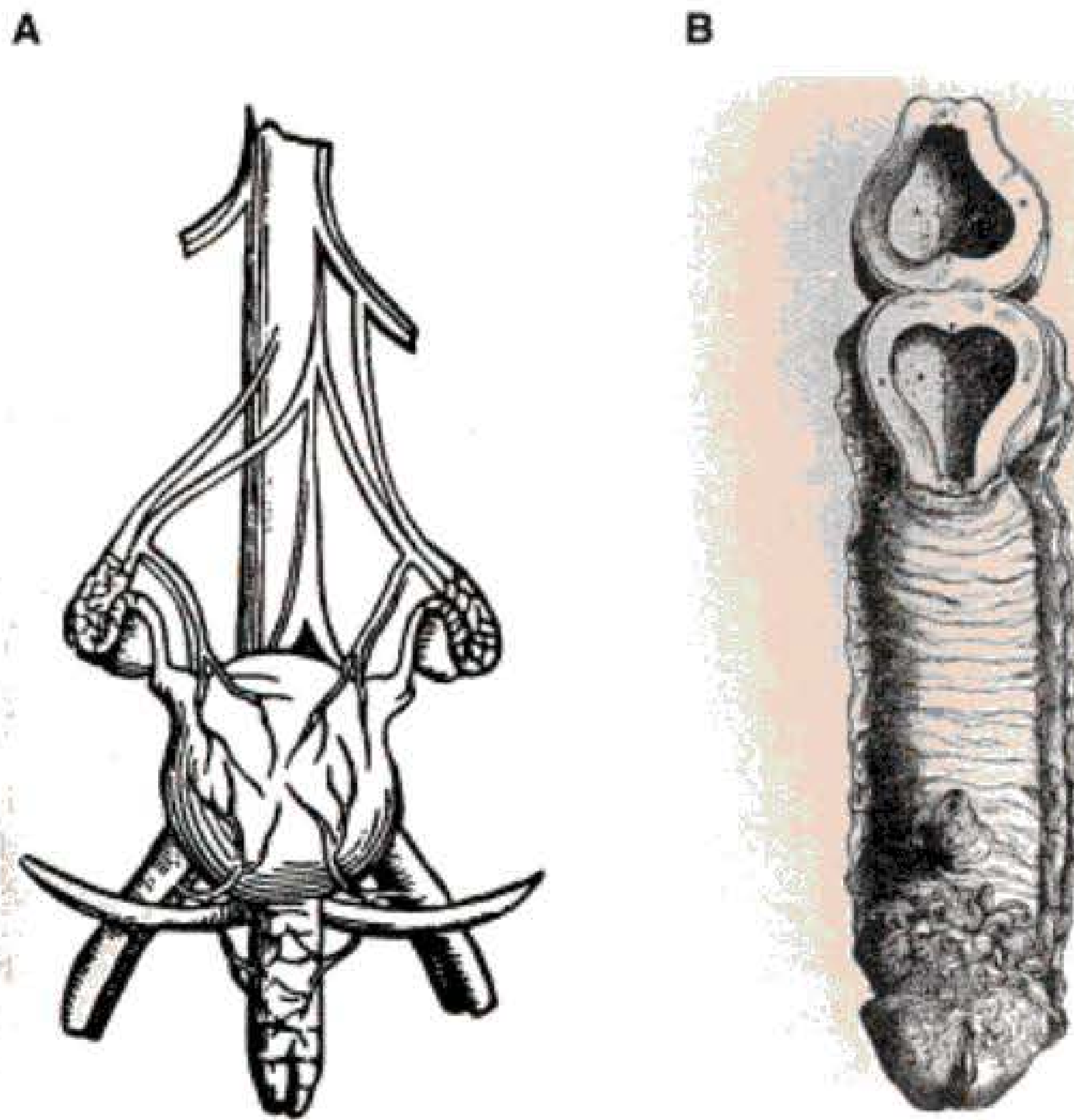


Fig. 17-1. Representación de Vesalius (1538, 1543) de los órganos del tracto reproductor femenino. **A.** Interpretación de la concepción de Galeno del tracto reproductor femenino, desde la vagina hacia el útero. **B.** Interpretación del sistema reproductor femenino. (Reimpreso en Schiebinger 1989.)

(gametos) que podían transmitir caracteres parentales y comenzó a ser estudiada la fisiología de los órganos sexuales. Todavía no había consenso acerca de cómo el sexo llegaba a ser determinado (véase Horowitz 1976; Tuana 1988; Schiebinger 1989).

> SITIO WEB 17.1 **Crítica social de la investigación de la determinación del sexo (Social critique of sex determination research).** En numerosas culturas, las mujeres han sido vistas como el "estado por defecto" de los hombres. Los historiadores y los biólogos han demostrado que hasta recientemente tales tendencias caracterizaron los estudios científicos de la determinación del sexo humana.

Hasta el siglo XX, se creía que el ambiente –temperatura y nutrición, en particular– era importante en la determinación del sexo. En 1890, Geddes y Thomson resumieron toda la información disponible sobre la determinación sexual y llegaron a la conclusión de que la "constitución, la edad, la nutrición y el ambiente de los padres deben ser especialmente considerados" en cualquiera de tales análisis. Sostuvieron que los factores que favorecen el almacenamiento de energía y nutrientes predisponían a tener descendencia femenina, mientras que los factores que favorecían la utilización de energía y nutrientes influían para tener descendencia masculina.

Esta opinión ambiental sobre la determinación del sexo se mantuvo como la única teoría científica principal hasta el redescubrimiento del trabajo de Mendel en 1900 y el redescubrimiento del cromosoma sexual por McClung en 1902. Sin embargo, no fue hasta 1905 que se estableció la correlación (en insectos) de sexo femenino con los cromosomas sexuales XX y de sexo masculino con los cromosomas XY o XO (Stevens 1905; Wilson 1905). Este hallazgo sugirió con firmeza que un componente nuclear específico era responsable de dirigir el desarrollo del fenotipo sexual. Por lo tanto, la evidencia demostraba que la determinación sexual se producía por herencia nuclear en lugar de ser por casualidad ambiental.

Hoy es conocido que pueden operar mecanismos ambientales e internos para la determinación del sexo en diferentes especies. Primero se discutirán los mecanismos cromosómicos de la determinación sexual y luego se considerará el modo en el que el ambiente regula el fenotipo sexual.

DETERMINACIÓN SEXUAL CROMOSÓMICA EN LOS MAMÍFEROS

Hay muchos modos por medio de los cuales los cromosomas pueden determinar el sexo de un embrión. En mamíferos; la presencia de un segundo cromosoma X o de un cromosoma Y determina si el embrión será hembra (XX) o macho (XY). En aves; la situación está invertida (Smith y Sinclair 2001): el macho tiene dos cromosomas sexuales similares (ZZ) mientras que la hembra tiene un par de cromosomas no comparables (ZW). En moscas, el cromosoma Y no juega ningún papel en la determinación del sexo, pero la proporción de cromosomas X en relación con los autosomas (los cromosomas no sexuales) determina el fenotipo sexual. En otros insectos (especialmente en himenopteranos como abejas, avispas y hormigas), los cigotos diploides fecundados se desarrollan hacia hembras, mientras que los gametos femeninos haploides sin fecundar llegan a ser machos (Beukeboom 1995). En este capítulo se discutirán solo dos de los muchos modos cromosómicos de determinación sexual: la determinación del sexo en los mamíferos placentados y la determinación del sexo en *Drosophila*.

Determinación del sexo primaria y secundaria en los mamíferos

La determinación sexual primaria es la determinación de las *gónadas*. En los mamíferos, la determinación sexual primaria es estrictamente cromosómica y, en general, no es influida por el ambiente. En la mayoría de los casos; la hembra es XX y el macho es XY. Cada individuo debe tener al menos un cromosoma X. Debido a que la hembra es XX, cada uno de sus gametos tiene un solo cromosoma X. El macho, al ser XY puede generar dos tipos de espermatozoides: la mitad llevará un solo cromosoma X, la otra mitad, un Y. Si el gameto femenino recibe otro cromosoma X del espermatozoide, el individuo resultante es XX, forma ovarios y es hembra; si el gameto femenino recibe un cromosoma Y del espermatozoide, el individuo es XY, forma testículos y es macho.

El cromosoma Y lleva un gen que codifica un **factor determinante testicular**. Este factor organiza la gónada hacia testículo en lugar de un ovario. A diferencia de la situación en *Drosophila* (discutida más adelante), el cro-

mosoma Y de mamífero es un factor crucial para la determinación sexual en mamíferos. Un individuo con cinco cromosomas X y un cromosoma Y (XXXXXY) debería ser masculino. Además, un individuo con un solo cromosoma X y sin un segundo cromosoma X o Y (es decir, XO) se desarrolla en sentido femenino y comienza a generar ovarios (aunque los folículos ováricos no pueden ser mantenidos; es necesario un segundo cromosoma X para un ovario completo).

La formación de ovarios y testículos son procesos activos dirigidos por genes. No hay un estado "por defecto" en la determinación sexual primaria de mamíferos. Además, como se verá, ambos divergen desde un precursor común; la gónada bipotencial.

La **determinación sexual secundaria** afecta el fenotipo fuera de las gónadas. Esto incluye el sistema de conductos masculino y femenino y a los genitales externos. Un macho de mamíferos tiene un pene, vesículas seminales y glándula prostática. Una hembra de mamíferos tiene una vagina, cuello uterino, útero, trompas de Falopio y glándulas mamarias. En muchas especies, cada sexo tiene un tamaño corporal, cartílagos vocales y musculatura específicos de sexo. Estas características sexuales secundaria son, en general, determinadas por hormonas secretadas desde las gónadas. Sin embargo, ante la ausencia de gónadas se genera un fenotipo femenino.Cuando Jost (1953) extirpó las gónadas fetales del conejo antes de que ellas se hubiesen diferenciado, los conejos resultantes tenían un fenotipo femenino, sin importar si ellos fuesen XY o XX. Cada uno de ellos tenía Trompas de Falopio, un útero y una vagina, y cada uno de ellos carecía de pene y estructuras accesorias de macho.

El esquema general de la determinación sexual de mamíferos se muestra en la figura 17-2. Si está ausente el cromosoma Y, el primordio de la gónada se desarrolla hacia ovario. Los ovarios producen **estrógeno**, una hormona que permite el desarrollo de los **conductos de Müller** hacia útero, trompas de Falopio (oviductos) y extremo superior de la vagina (Fisher y col. 1998; Couse y col. 1999; Couse y Korach 2001). Si el cromosoma Y está presente, se forman testículos y éstos secretan dos hormonas principales. La primera hormona –**hormona inhibidora de los conductos de Müller (HIM**; también referida como **factor inhibidor de Müller, FIM**)– destruye el conducto de Müller. La segunda hormona –**testosterona**– masculiniza al feto, y estimula la formación del pene, del sistema de conductos masculino, del escroto y de otras porciones de la anatomía del macho, además inhibe el desarrollo de los primordios de las glándulas mamarias. Por lo tanto, el cuerpo tiene el fenotipo femenino a menos que éste sea cambiado por las dos hormonas secretadas por los testículos fetales. Ahora se hará una observación más minuciosa sobre estos acontecimientos.

El desarrollo de las gónadas

Las gónadas manifiestan una situación embriológica única. Todos los otros rudimentos de los órganos pueden diferenciarse normalmente solo a un tipo de órgano. El rudimento del pulmón puede llegar a ser solo pulmón, y el rudimento hepático puede desarrollarse solamente a hígado. Sin embargo, el rudimento gonadal tiene dos opciones cuando se diferencia: puede desarrollarse hacia

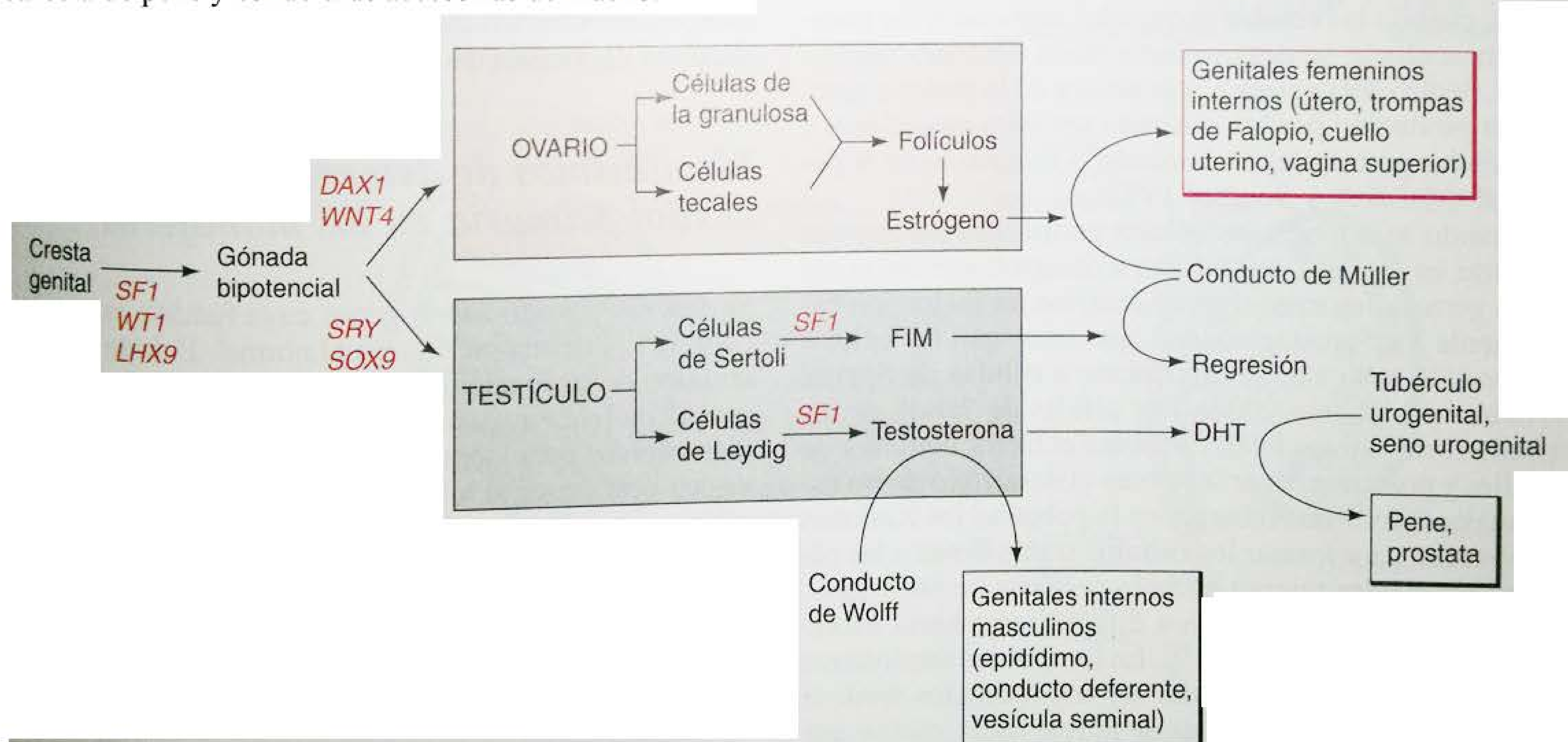


Fig. 17-2. Cascadas postuladas que conducen a la formación de los fenotipos sexuales en mamíferos. La conversión de la cresta genital hacia una gónada bipotencial requiere de los genes *LHX9*, *SF1* y *WT1*, debido a que la ausencia en ratones de cualquiera de estos genes produce la ausencia de las gónadas. La gónada bipotencial parece ser llevada hacia el sentido femenino (desarrollo de ovarios) por los genes *WNT4* y *DAX1* y hacia el sentido masculino (desarrollo de testículos) por el gen *SRY* (sobre el cromosoma Y) juntamente con genes autosómicos tales como *SOX9*. El ovario produce células tecales y células de la granulosa, que juntas son capaces de sintetizar estrógeno. Bajo la influencia de estrógeno (primero desde la madre, luego desde las gónadas fetales), el conducto de Müller se diferencia hacia el tracto reproductor femenino y los descendientes desarrollan caracteres sexuales secundarios femeninos. Los testículos producen dos hormonas principales. La primera, es el denominado factor inhibidor de Müller (FIM), que provoca la regresión de los conductos de Müller. La segunda, la testosterona, provoca la diferenciación del conducto de Wolff hacia genitales masculinos internos. En la región urogenital, la testosterona es convertida hacia dihidrotestosterona (DHT), y esta hormona causa la morfogénesis del pene y de la glándula prostática. (Según Marx 1995 y Birk y col. 2000.)

ovario o hacia testículo. El tipo de diferenciación tomado por este rudimento determina el futuro desarrollo sexual del organismo. Pero antes de que ocurra esta decisión, en primer lugar la gónada de mamíferos se desarrolla a través de un **estadio bipotencial (indiferente)**, durante dicho tiempo ésta no tiene características femeninas ni masculinas.

En humanos, los rudimentos de la gónada aparecen en el mesodermo intermedio durante la cuarta semana de desarrollo y se mantienen sexualmente indiferentes hasta la séptima semana. Los rudimentos de la gónada son regiones pares del mesodermo intermedio; se forman adyacentes a los riñones en desarrollo. Las porciones ventrales de los rudimentos de la gónada están compuestas del epitelio de la cresta genital. Durante el estadio indiferenciado, el epitelio de la cresta genital prolifera y se extiende hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático por arriba de ésta (fig. 17-3A,B). Estas capas epiteliales forman los **cordones sexuales**. Las células germinales migran hacia la gónada durante la sexta semana y son rodeadas por los cordones sexuales. En ambas gónadas XY y XX, los cordones sexuales se mantienen conectados al epitelio superficial.

Si el feto es XY, los cordones sexuales continúan proliferando durante la octava semana, extendiéndose profundamente hacia el tejido conectivo. Estos cordones forman una red de cordones sexuales internos (medulares) y, en el extremo más distal, la delgada **rete testis** (fig. 17-3C, D). Por último, los cordones sexuales –ahora denominados **cordones testiculares**– pierden su contacto con el epitelio superficial y se separan de éste por una gruesa matriz extracelular, la **túnica albugínea**. Por lo tanto, cuando las células germinales ingresan a las gónadas masculinas, se desarrollarán hacia cordones testiculares, dentro del órgano. Un inhibidor de la meiosis parece ser producido por los cordones sexuales masculinos y las células germinales no iniciarán la meiosis hasta la pubertad (McLaren y Southee 1997).

Cuando se inhibe a las células germinales presuntivas a entrar en meiosis, comienzan a desarrollarse como células germinales masculinas y secretan un factor (probablemente una prostaglandina) que hace que las células del cordón testicular se diferencien a **células de Sertoli** (Adams y McLaren 2002). Las células de Sertoli de los túbulos seminíferos fetales secretan el factor inhibidor de Müller y posteriormente sustentan el desarrollo de los espermatozoides. Sin embargo, en la pubertad los cordones se ahuecan para formar los **túbulos seminíferos** y las células germinales migran hacia la periferia de estos túbulos, donde ellos comienzan a diferenciarse hacia espermatozoides (véase fig. 19-19). En los túbulos seminíferos maduros, los espermatozoides son transportados desde el interior del testículo a través de la rete testis, que se une a los **conductillos eferentes**. Estos túbulos eferentes son los remanentes del riñón mesonéfrico y conectan el testículo al **conducto de Wolff**, que solía ser el tubo colector del riñón mesonéfrico* (véase cap. 15). En los machos, el conducto de Wolff se diferencia para llegar a ser **epidídimo** (adyacente al testículo) y el **conducto deferente**, el túbulo a través del cual los espermatozoides pasan hacia la uretra y fuera del cuerpo. Mientras tanto, durante el desarrollo fetal, las células mesenquimáticas de los testículos se diferencian a **células de Leydig**, que producen testosterona.

En las hembras, las células germinales se localizarán cerca de la superficie externa de la gónada. A diferencia de los cordones sexuales del macho, que continúa su proliferación, los cordones sexuales iniciales de las gónadas XX degeneran. Sin embargo, el epitelio rápidamente produce un nuevo grupo de cordones sexuales, que no penetran profundamente hacia el mesénquima, pero se localizan cerca de la superficie externa (corteza) del órgano. Por lo tanto, éstos se denominan **cordones sexuales corticales**. Estos cordones se separan en grupos, en los que cada uno de los grupos rodea a una célula germinal (fig. 17-3E, F). Las células germinales llegarán a ser los gametos femeninos maduros y los cordones sexuales corticales que las rodean se diferenciarán hacia **células de la granulosa**. Las células mesenquimáticas del ovario se diferencian a **células tecales**. Juntas, las células tecales y las de la granulosa formarán los **folículos** que envuelven a las células germinales y secretan hormonas esteroides. Cada folículo contendrá una sola célula germinal, que entrará en meiosis en este momento. Estas células germinales son requeridas por las células gonadales para completar su diferenciación a tejido ovárico* (McLaren 1991). En las hembras, el conducto de Müller se mantiene intacto y se diferencia a trompas de Falopio, útero, cuello uterino y vagina superior. El conducto de Wolf, privado de testosterona, degenera. En la figura 17-4 se muestra un resumen del desarrollo de los sistemas reproductores de mamíferos.

Mecanismos de determinación sexual primaria en los mamíferos

Se han encontrado varios genes cuya función es necesaria para la diferenciación sexual normal. Debido a que el fenotipo de las mutaciones en los genes de determinación sexual es frecuentemente estéril, se han utilizado estudios clínicos para identificar aquellos genes que son activos en determinar si los humanos llegan a ser masculinos o femeninos. Para confirmar las funciones de estos genes se pueden llevar a cabo manipulaciones experimentales en ratones.

* Como se discutió en el capítulo 14, el riñón mesonéfrico es uno de los tres tipos de riñones vistos durante el desarrollo de los mamíferos, pero éste no funciona como un riñón en la mayoría de ellos.

* Hay una relación recíproca entre las células germinales y las células somáticas gonadales. Las células germinales son originalmente bipotenciales y pueden llegar a ser espermatozoides o gametos femeninos. Sin embargo, una vez en los cordones sexuales masculinos o femeninos, se les dice que se mantengan en meiosis y se conviertan en gametos femeninos o que finalicen su meiosis y se conviertan en espermatozoides. Estas células germinales, posteriormente, diferencian la gónada en dirección masculina o femenina. Las células gonadales en desarrollo, además, luego guían la diferenciación de las células germinales. Por lo tanto, si las células germinales XY son colocadas en las gónadas XX, darán origen a ovocitos (Burgoyne y col. 1988).

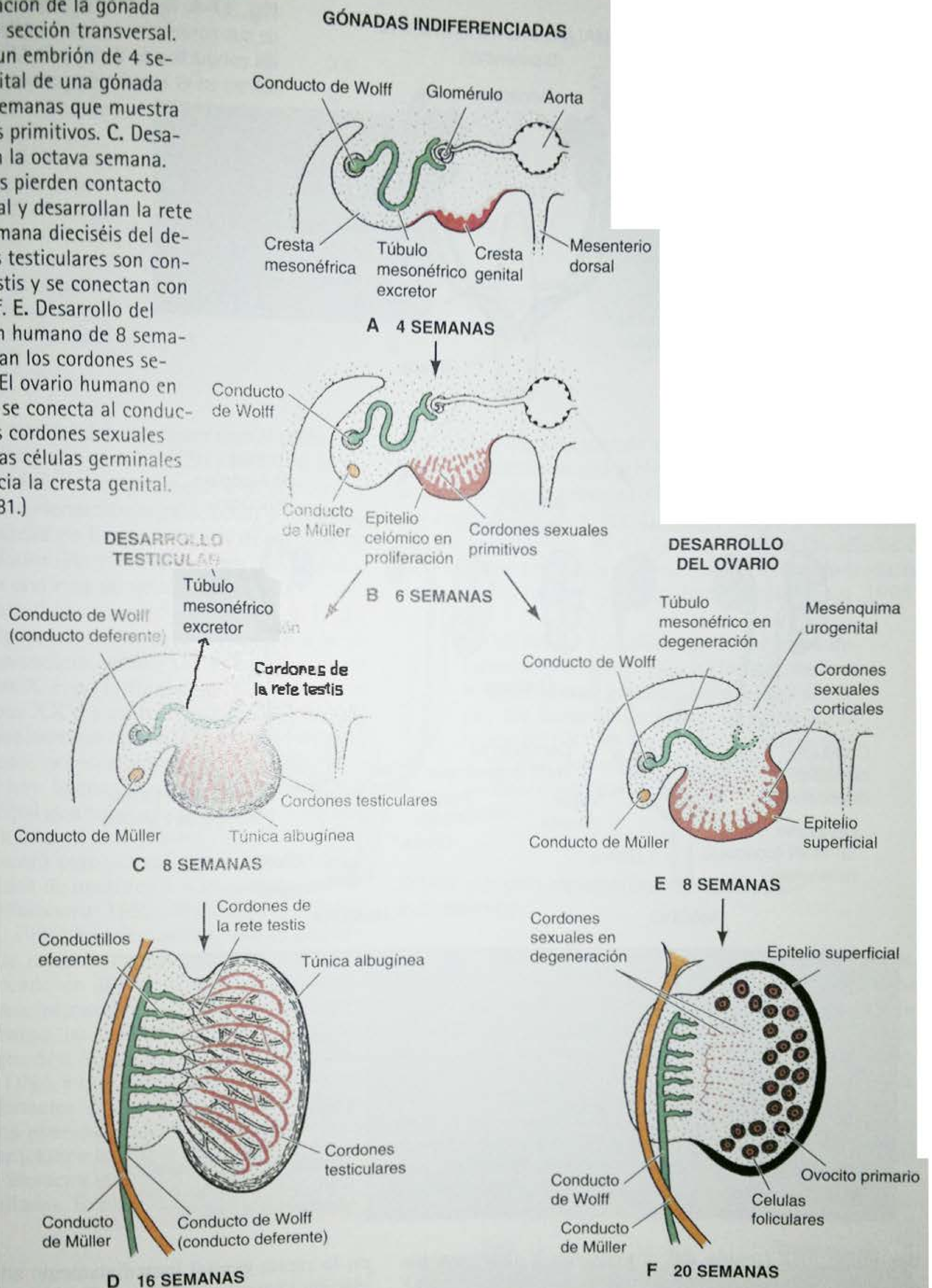


Fig. 17-3. Diferenciación de la gónada humana mostrada en sección transversal. **A.** Cresta genital de un embrión de 4 semanas. **B.** Cresta genital de una gónada indiferenciada de 6 semanas que muestra los cordones sexuales primitivos. **C.** Desarrollo del testículo en la octava semana. Los cordones sexuales pierden contacto con el epitelio cortical y desarrollan la rete testis. **D.** Hacia la semana dieciséis del desarrollo, los cordones testiculares son continuos con la rete testis y se conectan con el conducto de Wolff. **E.** Desarrollo del ovario en un embrión humano de 8 semanas, cuando degeneran los cordones sexuales primitivos. **F.** El ovario humano en la semana veinte no se conecta al conducto de Wolff y nuevos cordones sexuales corticales rodean a las células germinales que han migrado hacia la cresta genital. (Según Langman 1981.)

SRY: el cromosoma Y determinante del sexo

En los seres humanos, el principal gen para la determinación del testículo se localiza sobre el brazo corto del cromosoma Y. Los individuos que han nacido con el brazo corto pero sin el brazo largo sobre el cromosoma Y son masculinos, mientras que los individuos nacidos con el brazo largo del cromosoma Y pero sin el brazo corto son femeninos. Mediante el análisis del DNA de casos poco comunes de hombres XX y mujeres XY, la posición del gen determinante testicular fue restringida a una región de 35.000 pares de bases del cromosoma Y localizada cerca de la punta del brazo corto. En esta región, Sinclair y colegas (1990) hallaron una secuencia específica que puede codificar un péptido de 223 aminoácidos. Este péptido probablemente es un factor de transcripción, debido a que contiene un dominio de unión al DNA denominado la **caja HMG** (grupo de alta movilidad; del inglés, *high-mobility group*). Este dominio es hallado en varios factores de transcripción y en las proteínas no histónicas de la cromatina e induce la curvatura en la región del DNA para que el factor se una (Giese y col. 1992). Este gen se

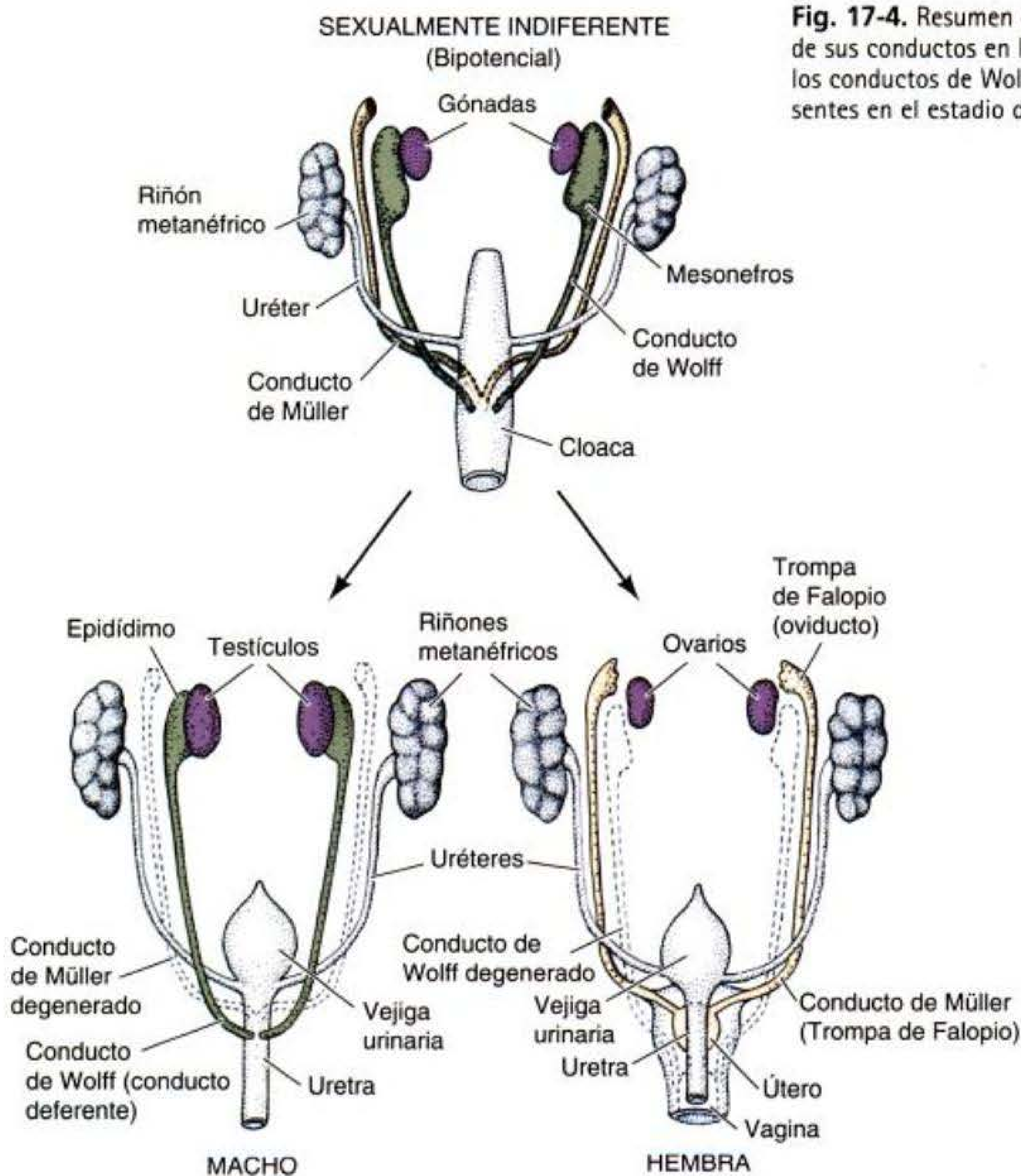


Fig. 17-4. Resumen del desarrollo de las gónadas y de sus conductos en los mamíferos. Obsérvese que los conductos de Wolff y de Müller juntos están presentes en el estadio de gónada indiferente.

GÓNADAS		
Tipo gonadal	Testículo	Ovario
Cordones sexuales	Medulares (internos)	Corticales (externos)
CONDUCTOS		
Conducto remanente para las células germinales	Wolff	Müller
Diferenciación del conducto	Conducto deferente, epidídimo, vesícula seminal	Trompa de Falopio (oviducto), útero, cuello uterino, porción superior de la vagina

denomina *SRY* (región del cromosoma Y determinante del sexo; del inglés, *sex-determining region of the Y chromosome*) y hay abundante evidencia que indica que éste es, en efecto, el gen que codifica el factor determinante testicular humano. *SRY* se encuentra en los machos XY normales y en los machos XX poco frecuentes y está ausente en hembras XX normales y en muchas hembras XY. Se halló otro grupo de hembras XY que tenían mutaciones puntuales o de desplazamientos en el marco de lectura en el gen SRY; estas mutaciones evitaban la unión de la proteína SRY al DNA o la curvatura de este último (Pontiggia y col. 1994; Werner y col. 1995).

Si el gen *SRY* codifica realmente el principal factor determinante testicular, debería esperarse que éste actuara en la cresta genital inmediatamente antes de la diferenciación testicular o durante ella. Esta predicción ha sido encontrada en estudios de genes homólogos hallados en ratones. El gen de ratón (*Sry*) también se correlaciona con la presencia de testículos; éstos están presentes en los machos XX y ausentes en las hembras XY (Gubbay y col. 1990; Koopman y col. 1990). El gen *Sry* se expresa en las células somáticas de la gónada bipotencial de ratón antes de su diferenciación hacia testículo o durante ella; su expresión luego desaparece (Hacker y col. 1995).

La evidencia más impresionante para que *Sry* siga siendo el factor determinante testicular viene de los ratones transgénicos. Si *Sry* induce la formación testicular, entonces la inserción de DNA de *Sry* en el genoma de un

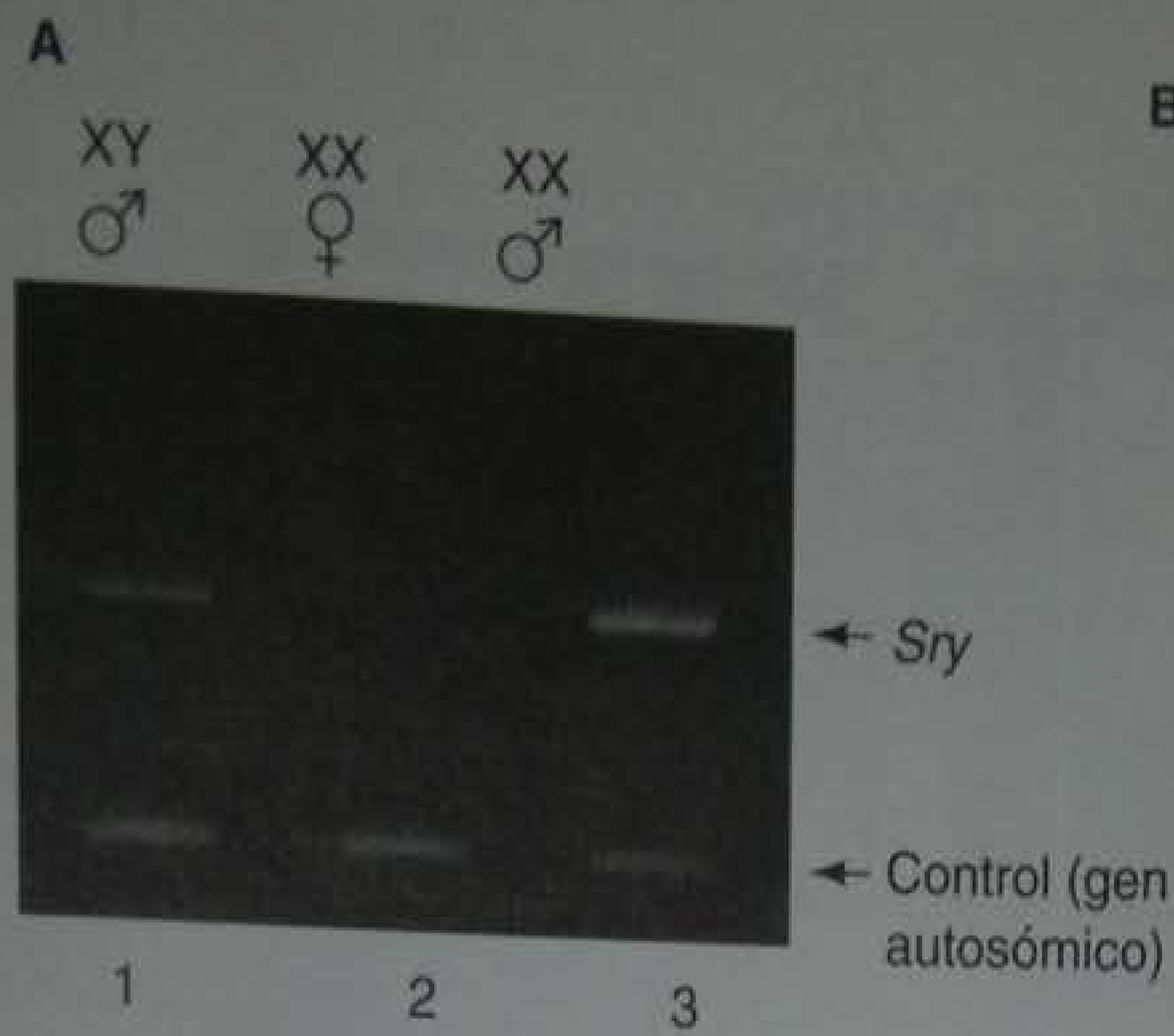


Fig. 17-5. Un ratón XX transgénico para *Sry* es macho. **A.** La reacción en cadena de la polimerasa seguida por electroforesis muestra la presencia del gen *Sry* en machos XY normales y en un ratón transgénico XX/*Sry*. El gen está ausente en un hembra XX compañera de camada. **B.** Los genitales externos de un ratón transgénico son los de un macho (derecha) y son esencialmente los mismos que aquellos en un macho XY (izquierda). (De Koopman y col. 1991; fotografías cortesía de los autores.)

cigoto de ratón XX normal debería hacer que el ratón XX forme testículos. Koopman y col. (1991) tomaron la región de DNA de 14 kilobases que incluye al gen *Sry* (y presumiblemente sus elementos reguladores) y microinyectaron esta secuencia en los pronúcleos de cigotos de ratón recién fecundados. En varios ejemplos, los embriones XX inyectados con esta secuencia desarrollaron testículos, órganos masculinos accesorios y pene (fig. 17-5). (No se formaron espermatozoides funcionales, pero no se esperaba que esto sucediera debido a que la presencia de los dos cromosomas X evita la formación de espermatozoides en los ratones XXY y en los hombres, y los ratones transgénicos que carecen del resto del cromosoma Y, que contiene los genes necesarios para la espermatogénesis.) Por lo tanto, hay buenas razones para pensar que *Sry/SRY* es el principal gen sobre el cromosoma Y para la determinación testicular en mamíferos.

Sry/SRY es necesario pero no suficiente para el desarrollo de los testículos de mamíferos. Los estudios en ratones (Eicher y Washburn 1983; Washburn y Eicher 1989; Eicher y col. 1996) han demostrado que el gen *Sry* de algunas cepas de ratones fracasa en producir testículos cuando es colocado en una cepa de ratón diferente. Debería haber alguna interacción entre Sry y alguno otro factor(es). Sin embargo, no se conocen bien los cofactores y blancos del gen *Sry*. Se ha pensado que la proteína Sry debe unirse al DNA y que debe curvar el DNA acercando proteínas distantes del aparato de transcripción para que adopten un estrecho contacto, permitiéndoles a estas proteínas interactuar e iniciar la transcripción (Pontiggia y col. 1994; Werner y col. 1995). Pero tales proteínas no han sido halladas. Evidencia reciente sugiere que Sry podría estar actuando en los espliceosomas a nivel del procesamiento del RNA. Ohe y colegas (2002) demostraron que la proteína SRY humana se colocaliza con los espliceosomas y que funciona en el procesamiento del pre-mRNA (fig. 17-6). Se han visto en las células de Sertoli como un patrón de localización moteado (característico de los factores de empalme) (Poulat y col. 1995).

SITIO WEB 17.2 **Hallazgo de los genes determinantes masculinos (Finding the male-determining genes).** Llevar a cabo el mapeo del factor determinante testicular en la región del SRY les tomó a los científicos más de 50 años. Además, se han encontrado sobre los autosomas otros genes formadores de testículo.

SOX9: un gen determinante testicular autosómico

SRY puede tener más de un modo de acción en la transformación de las gónadas bipotenciales en testículos. Se había asumido en la década pasada que SRY actuaba directamente en la cresta genital para convertir el epitelio en células de Sertoli específicas del macho. Sin embargo, no se encontró ningún gen cuya expresión sea activada mediante la unión de Sry a sus promotores, potenciadores o a las regiones de empalme de sus transcritos. El candidato más prometedor para este papel es otra proteína de caja HMG, **SOX9**. *SOX9* es un gen autosómico que también puede inducir la formación testicular. Los huma-



Fig. 17-6. Colocalización de SRY y de RNA del factor de procesamiento SC-35. **A.** Anticuerpos para SRY (rojo) y para el RNA del factor de procesamiento SC-35 (verde) fueron incubados sobre células tumorales de célula germinal de macho que expresaban SRY. La superposición entre los anticuerpos verde y rojo (amarillo) demuestra la colocalización de estas proteínas. **B.** Cuando las células fueron inyectadas con oligonucleótidos antisentido dirigidas contra un RNA pequeño nuclear de espliceosoma, los espliceosomas se agregan en grandes grupos. La proteína SRY se colocaliza con estos nuevos agregados. (De Ohe y col. 2002.)

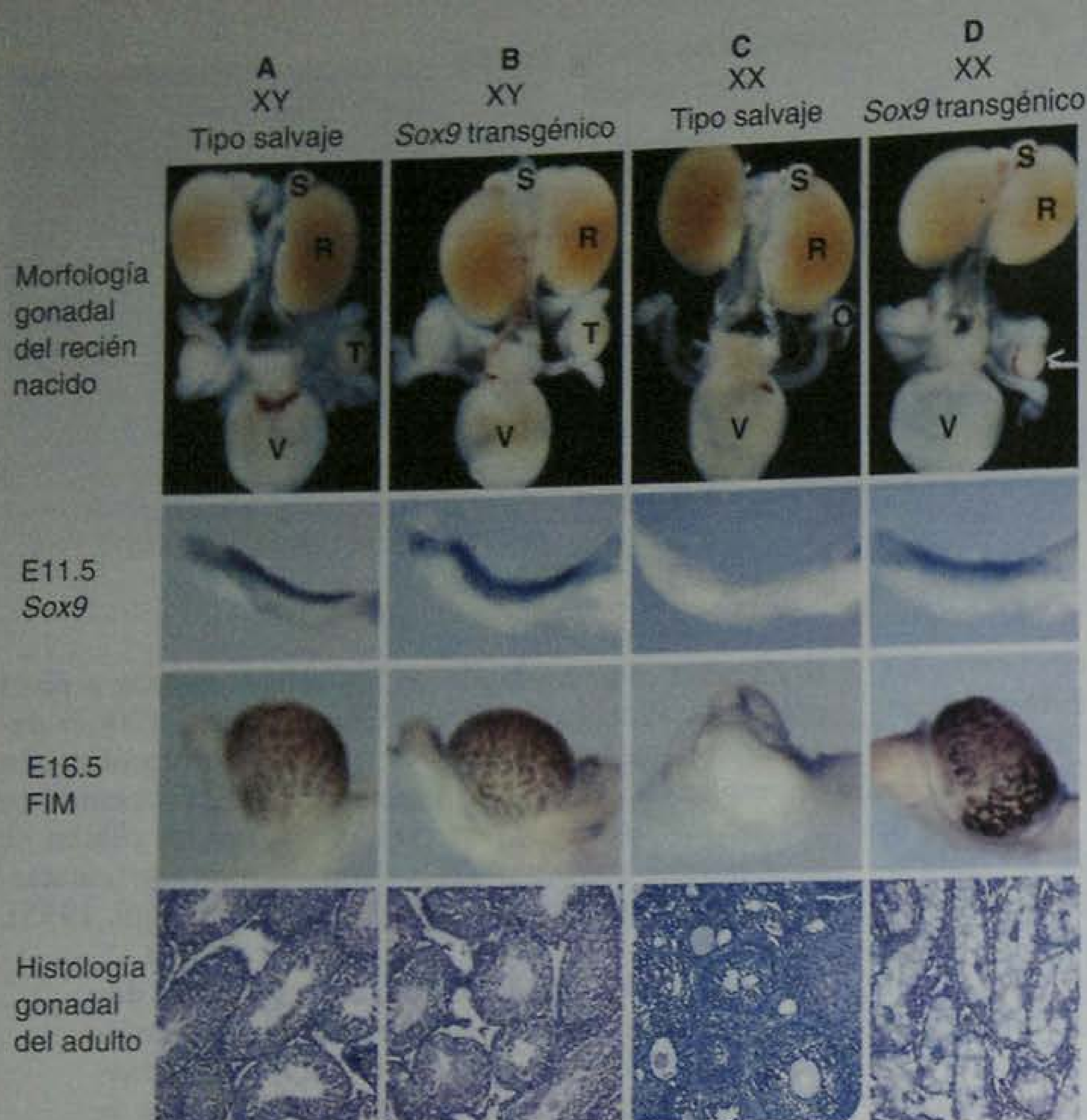


Fig. 17-7. Capacidad de *Sox9* para generar testículos. **A.** Un embrión de ratón XY tipo salvaje expresa *Sox9* en la cresta genital a los 11,5 días, factor inhibidor del conducto de Müller (FIM) en las células de Sertoli de la gónada embrionaria a los 16,5 días y finalmente forma los testículos descendidos (T) con túbulos seminíferos. **B.** Un embrión XY con el transgén Sox9 (un control para los defectos del transgén) también muestra la expresión de *Sox9*, la expresión de FIM y testículos descendidos con túbulos seminíferos. **C.** Los embriones XX tipo salvaje no muestran expresión de *Sox9* ni de FIM. Estos construyen ovarios con células foliculares maduras. **D.** Un embrión XX con el transgene *Sox9* expresa el gen *Sox9* y tiene FIM en sus células de Sertoli de 16,5 días. Éstos tienen testículos descendidos, pero los túbulos seminíferos carecen de espermatozoides (debido a la presencia de dos cromosomas X en las células de Sertoli). R, riñones; S, glándulas suprarrenales; V, vejiga; T, testículo; O, ovario. (De Vidal y col. 2001; microfotografías cortesía de A. Schedl.)

nos XX que tienen una copia extra de *SOX9* se desarrollan como masculinos, incluso si no tienen gen *SRY* y los ratones transgénicos para *Sox9* desarrollan testículos (fig. 17-7; Huang y col. 1999; Vidal y col. 2001). Los individuos que tienen solamente una copia funcional de este gen tienen un síndrome denominado displasia campomélica, una enfermedad que involucra a numerosos huesos esqueléticos y sistemas de órganos. Cerca del 75% de los pacientes XY con este síndrome se desarrollan como fenotipos femeninos o hermafroditas (Foster y col. 1994; Wagner y col. 1994; Mansour y col. 1995). Por esta razón, parece ser que *SOX9* puede reemplazar a *SRY* en la formación testicular. Esto no es completamente sorprendente: mientras que *Sry* es hallado específicamente en mamíferos, *Sox9* es hallado en todos los vertebrados. *Sox9* puede ser el gen de determinación del sexo más antiguo y más central, y en mamíferos puede ser activado por su pariente, *Sry*. Por lo tanto, *Sry* puede actuar simplemente como un "interruptor" para activar a *Sox9* y la proteína Sox9 puede iniciar la vía evolutiva conservada para la formación testicular (Pask y Graves 1999).

La proteína Sox9 puede actuar como un factor de empalme y como un regulador transcripcional. Sox9 migra hacia el núcleo en el momento de la determinación sexual. Aquí, se une a un sitio promotor sobre el gen para el factor inhibidor de Müller, proporcionando un enlace crítico en la vía hacia un fenotipo masculino (Arango y col. 1999; de Santa Barbara y col. 2000). SOX9 también parece estar involucrado en el empalme de RNA y puede reemplazar factores de empalme desaparecidos en ensayos de empalmes experimentales (Ohe y col. 2002). La investigación es sobre los genes que Sry o Sox9 podrían regular (Koopman 2001).

Algunas de las principales preguntas en relación a la determinación sexual masculina siguen sin ser respondidas, incluido: 1) ¿qué activa al gen *Sry*?, 2) ¿qué hace la proteína Sry activada?, 3) ¿cómo podría funcionar esta activación?, 4) ¿el gen *Sox9* es activado por Sry? y 5) ¿a qué genes activa SOX9? Como se verá, la determinación sexual en *Drosophila* funciona gran parte a través del procesamiento del RNA; entonces si Sry y Sox9 actúan como factores de empalme de RNA, los esquemas de determinación del sexo de mamíferos y de *Drosophila* pueden tener más en común de lo que se pensaba originalmente.

Factor de crecimiento fibroblástico 9

Uno de los genes regulados por Sry o Sox9 puede codificar un factor de crecimiento fibroblástico. Estudios recientes (Capel y col. 1999) han sugerido que sry (o Sox9) funciona a través de un mecanismo indirecto: Sry en las células de la cresta genital induce a aquellas células a secretar un factor quimiotáctico que permite la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada XY. Las células mesonéfricas luego inducen al epitelio gonadal a ser células de Sertoli con patrones de expresión de genes específicos masculinos. Los investigadores hallaron que, cuando cultivaban gónadas XX con mesonefros XX o XY, las células mesonéfricas no ingresaban a las gónadas. Sin embargo, cuando cultivaron mesonefros XX o XY con gónadas XY o con gónadas desde ratones XX que contenían el transgén *Sry*, las células mesonéfricas entraban a las gónadas (fig. 17-8A,B). Había estrictas correlaciones entre la presencia de Sry en las células gonadales, la migración celular mesonéfrica y la formación de cordones testiculares. Tilmann y Capel (1999) demostraron que las células mesonéfricas son críticas para la formación de cordones testiculares y que las células mesonéfricas en migración pueden inducir a células gonadales

A

Embrión de ratón de 12 días

XY (o XX + *Sry*) | XX o XY + *lacZ* | XX (o XY – *Sry*)

Gónada

Extirpación del rudimento urogenital

Mesonefros

Separación de las gónadas del mesonefros

Recombinación y cultivo de 48 horas

(1) + *Sry*: Permite la migración de las células mesonéfricas

(2) – *Sry*: Sin migración celular mesonéfrica

B

XX | XX o XY + *lacZ* | XX

Fgf9

(1) Sin migración celular mesonéfrica

(2) FGF9: Permite la migración de las células mesonéfricas

C



Fig. 17-8. Migración de las células mesonéfricas hacia los rudimentos gonadales *Sry*+. En el experimento esquematizado, las crestas urogenitales (que contienen los riñones mesonéfricos y los rudimentos gonadales bipotenciales) fueron tomadas de ratones embrionarios de 12 días. Algunos de los ratones fueron marcados con un transgén para β-galactosidasa (*lacZ*) que es activo en cada una de las células. Por lo tanto cada célula de estos ratones vira al azul cuando son teñidas para β-galactosidasa. La gónada y el mesonefros fueron separados y recombinados, utilizando tejido gonadal de ratones no marcados y de mesonefros de ratones marcados. **A.** Se observa migración de las células mesonéfricas hacia la gónada: 1) cuando las células de la gónada eran XY o 2) cuando ellas eran XX con un transgén *Sry*. No se observó migración de tejido mesonéfrico hacia la gónada cuando la gónada contenía células XX o células XY en la que el cromosoma Y tenia una supresión en el gen *Sry*. Los cromosomas sexuales del mesonefros no afectaron la migración. **B.** Los rudimentos de la gónada para los ratones XX que pueden inducir la migración celular mesonéfrica en estos rudimentos han sido incubados con FGF9. **C.** Íntima relación entre los conductos mesonéfricos y la gónada en desarrollo en el embrión de ratón macho de 16 días. El tejido ductal ha sido teñido para citoqueratina-8. (**A**, **B**, según Capel y col. 1999, microfotografías cortesía de B. Capel; **C**, de Sariola y Saarma 1999, microfotografía cortesía de H. Sariola.)

XX a formar cordones testiculares. Parece, entonces, que Sry puede funcionar, al menos en parte, indirectamente para crear testículos por inducción de migración celular mesonéfrica hacia la gónada.

Un factor testicular crítico que induce la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada es el factor de crecimiento fibroblástico 9 (Colvin y col. 2001). Cuando se hace el knockout del gen *Fgf9* en ratones, los mutantes homocigotas son casi todos hembras. El análisis de estos ratones indica que Fgf9 es importante en la estimulación de la división celular de las células de Leydig (productoras de testosterona), fomentando la diferenciación de las células de Sertoli y atrayendo a las células mesonéfricas hacia la gónada. La incubación de las gónadas XX en Fgf9 permitió entonces la atracción de células mesonéfricas (fig. 17-8).

SF1: el enlace entre SRY y las vías de desarrollo de macho

Otra proteína que puede ser activada directa o indirectamente por Sry es el factor de transcripción **Sf1** (factor esteroidogénico 1; del inglés, *steroidogenic factor 1*). Sf1 es necesario para generar la gónada bipotencial, pero mientras que los niveles de Sf1 disminuyen en la cresta genital de los embriones de ratón XX, el gen *Sf1* permanece sobre el testículo en desarrollo. Sf1 parece ser activo en la masculinización de las células de Leydig y de las células de Sertoli. En las células de Sertoli, Sf1, que funciona en colaboración con Sox9, es necesario para elevar los niveles de transcripción de FIM (Shen y col. 1994; Arango y col. 1999). En las células de Leydig, Sf1 activa a los genes que codifican las enzimas que producen testosterona. En los seres humanos, la importancia de SF1 para el desarrollo del testículo y la regulación de FIM es demostrado por un paciente XY que es heterocigota para *SF1*. Aunque los genes para SRY y SOX9 son normales, este individuo tiene gónadas fibrosas malformadas y conserva estructuras del conducto de Müller completamente desarrolladas (Achermann y col. 1999). Se piensa que SRY (de manera directa o indirecta) mantiene la expresión de *SF1* y que la proteína SF1 luego está involucrada en la activación de FIM en las células de Sertoli y de testosterona en las células de Leydig.

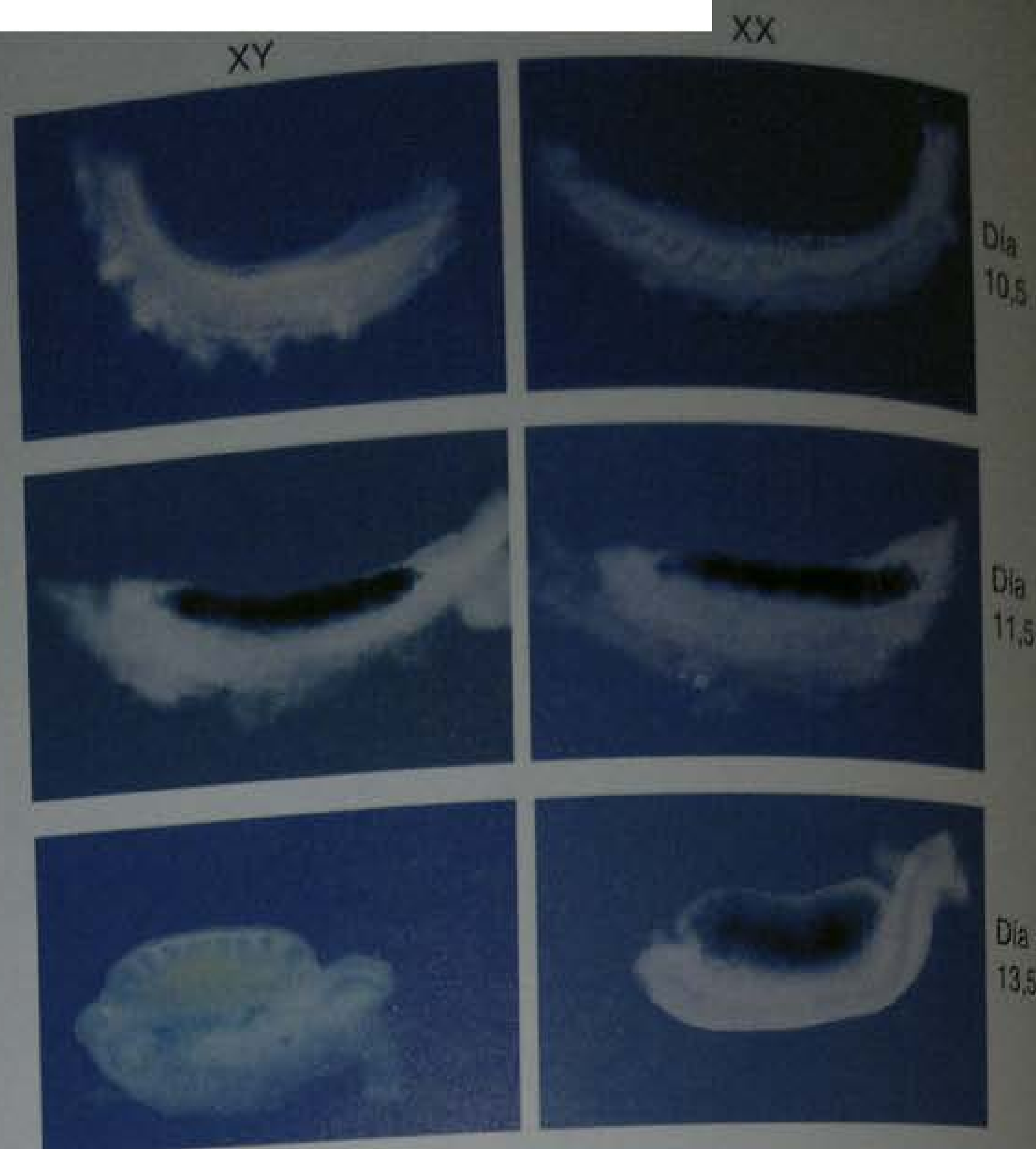


Fig. 17-10. Expresión de *Dax1* en la cresta genital del ratón. Un gen *lacZ* fue fusionado a la región regulatoria de *Dax1* y el transgén resultante insertado en embriones de ratón XY (izquierda) y XX (derecha). En ambos ejemplos, *Dax1* fue expresado en el día 11,5 en las crestas genitales. Sin embargo, hacia el día 13,5 la expresión de *Dax1* persistió en los rudimentos gonadales XX, pero no en los de los embriones XY. (Según Swain y col. 1998; microfotografías cortesía de R. Lovell-Badge.)

DAX1: un potencial gen supresor de testículo sobre el cromosoma X

En 1980, Bernstein y colegas describieron dos hermanas que eran genéticamente XY. Sus cromosomas Y eran normales, pero ellas tenían una duplicación de una pequeña porción del brazo corto del cromosoma X. Cuando fueron hallados casos similares, se concluyó que si hubiese dos copias de esta región sobre el cromosoma X activo, la señal *SRY* debería ser inhibida (fig. 17-9). Bardoni y sus colegas (1994) propusieron que esta región contiene un gen que codifica una proteína que compite con el factor *SRY* y que es importante para dirigir el desarrollo del ovario. En los embriones XY, este gen debería ser suprimido, pero al tener dos copias activas del gen se debiera anular esta supresión. Este gen, *DAX1*, ha sido clonado y se demostró que codifica un miembro de una familia de receptor nuclear de hormona (Muscatelli y col. 1994; Zanaria 1994). *Dax1* se expresa inicialmente en las crestas genitales de los embriones de ratón macho y hembra y éste es visto en los ratones macho poco tiempo después de la expresión de *Sry*. En efecto, en los ratones XY, *Sry* y *Dax1* se expresan en las mismas células. Sin embargo, finalmente *Dax1* se expresa solamente en el rudimento gonadal XX (fig. 17-10). *Dax1* parece antagonizar la función de *Sry* y *Sox9*, y regula en menos la expresión de *Sf1* (Nachtigal y col. 1998; Swain y col. 1998).

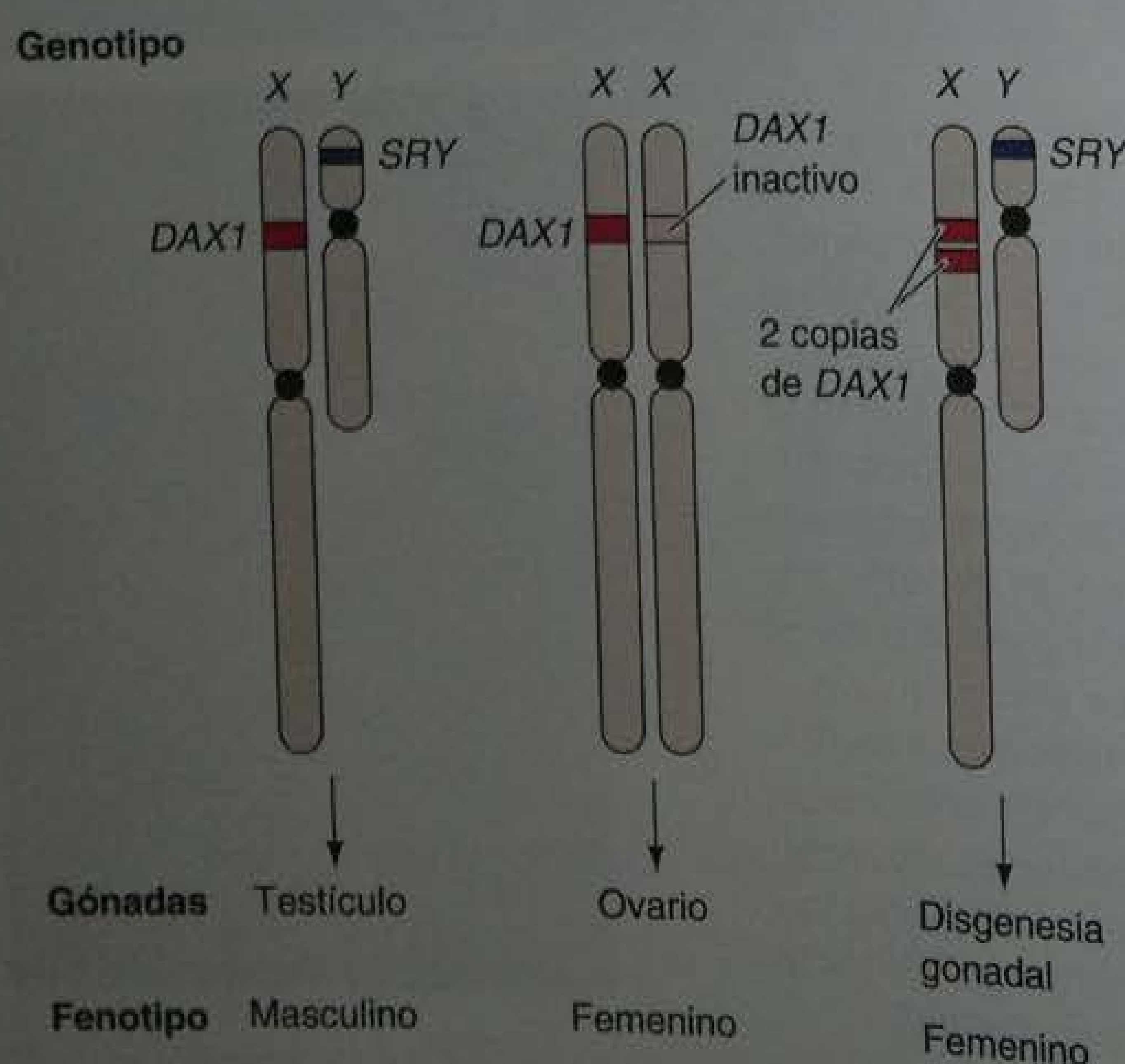


Fig. 17-9. Fenotipo de inversión sexual en seres humanos que tienen dos copias del locus de *DAX1*. *DAX1* (sobre el cromosoma X) más *SRY* (sobre el cromosoma Y) producen testículos. *DAX1* sin *SRY* (debido a que el otro locus de *DAX1* está sobre el cromosoma X inactivo) produce ovarios. Dos copias activas de *DAX1* (sobre el cromosoma X activo) más SRY (sobre el cromosoma Y) llevan a una gónada pobremente formada. Debido a que la gónada no produce FIM ni testosterona, el fenotipo es masculino. (Según Genetics Review Group 1995.)

WNT4: un potencial gen de determinación del ovario sobre un autosoma

El gen *Dax1* parece ser activado por el producto de un gen determinante del ovario, ***Wnt4***. *Wnt4* se expresa en la cresta genital del ratón mientras todavía se encuentra en el estadio bipotencial. La expresión de *Wnt4* entonces llega a ser indetectable en las gónadas XY (que llegan a ser testículos), mientras que es mantenida en las gónadas

XX a medida que ellas comienzan a formar ovarios. En los ratones transgénicos XX que carecen del gen *Wnt4*, el ovario no se forma apropiadamente y sus células expresan marcadores específicos de testículo, incluyendo enzimas y testosterona que producen FIM (Vainio y col. 1999). Un posible blanco para Wnt4 es el gen que codifica TAF_{II} 105 (Freiman y col. 2002). Esta subunidad de proteína que se une a TATA para la unión de la RNA polimerasa se ve solamente en las células foliculares del ovario. Las ratonas hembras que carecen de esta subunidad no tienen ovarios. En los seres humanos XY que tienen una duplicación de la región *WNT4*, DAX1 es producida en exceso y las gónadas se desarrollan hacia ovarios (Jordan y col. 2001). Sry puede formar testículos mediante la represión de la expresión de *Wnt4* en la cresta genital, así como mediante la estimulación de *Sf1*. Un modelo posible se muestra en la fig. 17-11.

Aunque en los años recientes se ha hecho un destacable progreso, todavía no se sabe qué genes están llevando a cabo la determinación del testículo –o del ovario– y el problema de la determinación sexual primaria se mantiene (como ha sido desde la prehistoria) como uno de los grandes problemas sin resolver de la biología.

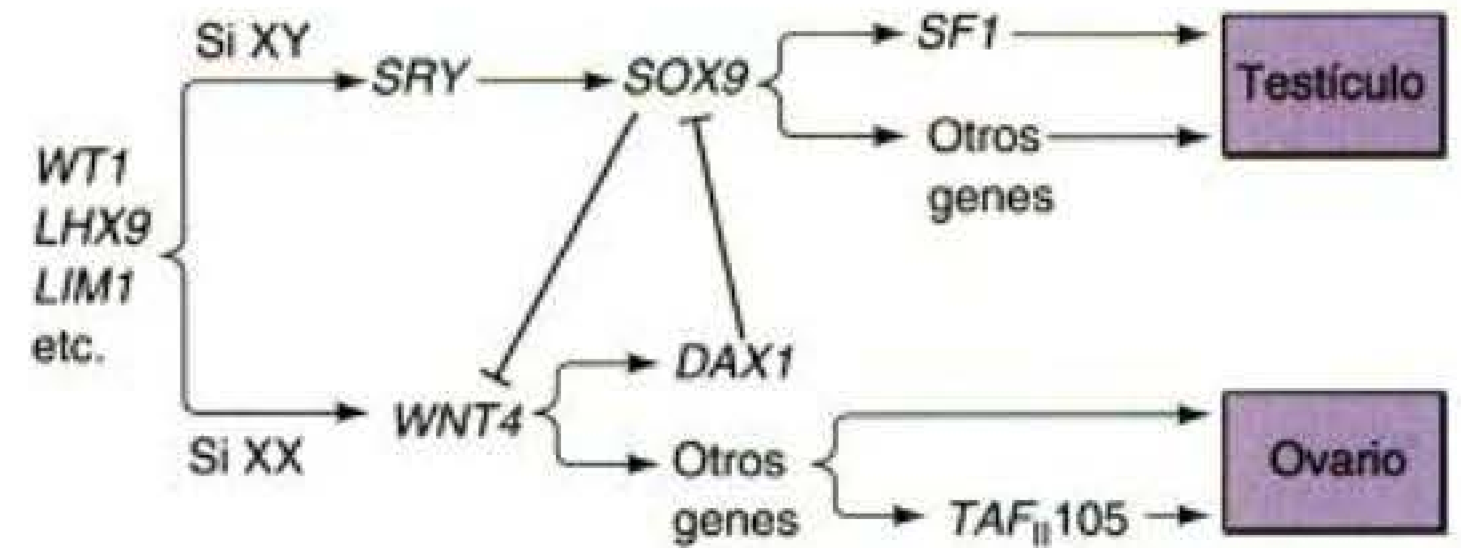


Fig. 17-11. Mecanismos posibles para la determinación sexual primaria en mamíferos. Mientras que nos se conocen las interacciones específicas involucradas, este modelo intenta organizar los datos hacia una secuencia coherente. Otros modelos son posibles. En este modelo, *SRY* y *WNT4* son activados en el rudimento gonadal. Si no está presente la proteína SRY, WNT4 activa a los genes formadores de ovario, así como al gen *DAX1* supresor del testículo. Si el gen SRY está presente, activa a SOX9 que activa a los genes formadores de testículo, como SF1 y FIM, además suprime a WNT4.

Determinación sexual secundaria: regulación hormonal del fenotipo sexual

La determinación sexual primaria involucra la formación de un ovario o un testículo desde la gónada bipotencial. Sin embargo, este proceso no da el fenotipo sexual completo. La determinación sexual secundaria en mamíferos involucra el desarrollo de los fenotipos femenino y masculino en respuesta a hormonas secretadas por los ovarios y los testículos. La determinación sexual secundaria de la hembra y el macho tiene dos fases temporales principales. La primera fase se produce dentro del embrión durante la organogénesis; la segunda ocurre en la pubertad.

Como se mencionó antes, si las gónadas bipotenciales son extirpadas desde un embrión de mamífero, se lleva a cabo el fenotipo femenino: se desarrollan los conductos de Müller mientras que degeneran los conductos de Wolff. Este patrón también se observa en ciertos seres humanos que han nacido sin gónadas funcionales. Los individuos cuyas células tienen solo un cromosoma X (y sin cromosoma Y) originalmente desarrollan ovarios, pero estos ovarios se atrofian antes del nacimiento y las células germinales mueren antes de la pubertad. Sin embargo, bajo la influencia de estrógeno, derivado primero del ovario pero luego de la madre y de la placenta, estos niños nacen con un tracto genital femenino (Langman y Wilson 1982).

La formación de un fenotipo macho involucra la secreción de hormonas testiculares. La primera de estas dos hormonas es FIM, la hormona producida por las células de Sertoli que causa la degeneración del conducto de Müller. La segunda es la hormona esteroidea testosterona, que es secretada desde las células de Leydig fetales. Esta hormona hace que el conducto de Wolff se diferencie a epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales y hace que las prominencias urogenitales se desarrollen hacia escroto y pene.

La existencia de estos dos sistemas independientes de masculinización es demostrada por los individuos con **síndrome de insensibilidad a los andrógenos.** Estos individuos XY tienen el gen *SRY* y por lo tanto tienen testículos que producen testosterona y FIM. Sin embargo, ellos carecen de la proteína receptora de testosterona y por esta razón no pueden responder a la testosterona producida por sus testículos (Meyer y col. 1975). Debido a que ellos son capaces de responder a los estrógenos producidos en sus glándulas suprarrenales, desarrollan el fenotipo femenino (fig. 17-12). Sin embargo, a pesar de su apariencia femenina indiscutible, estos individuos tienen

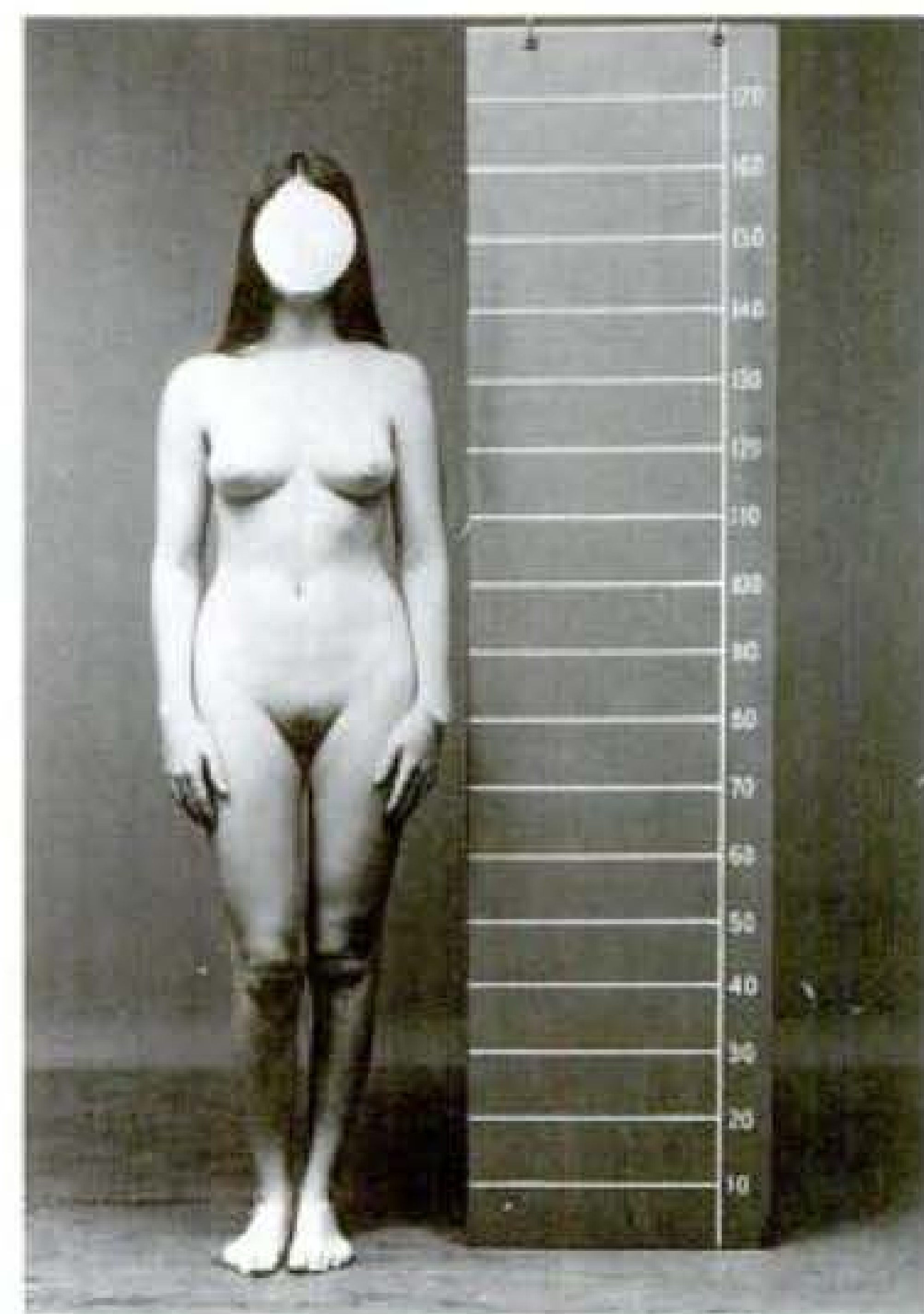


Fig. 17-12. Individuo XY con un síndrome de insensibilidad a los andrógenos. A pesar del cariotipo XY y de la presencia de testículos, estos individuos desarrollan características sexuales secundarias femeninas. Sin embargo, internamente estas mujeres carecen de derivados de los conductos de Müller y tienen testículos sin descender. (Fotografía cortesía de C. B. Hammond.)

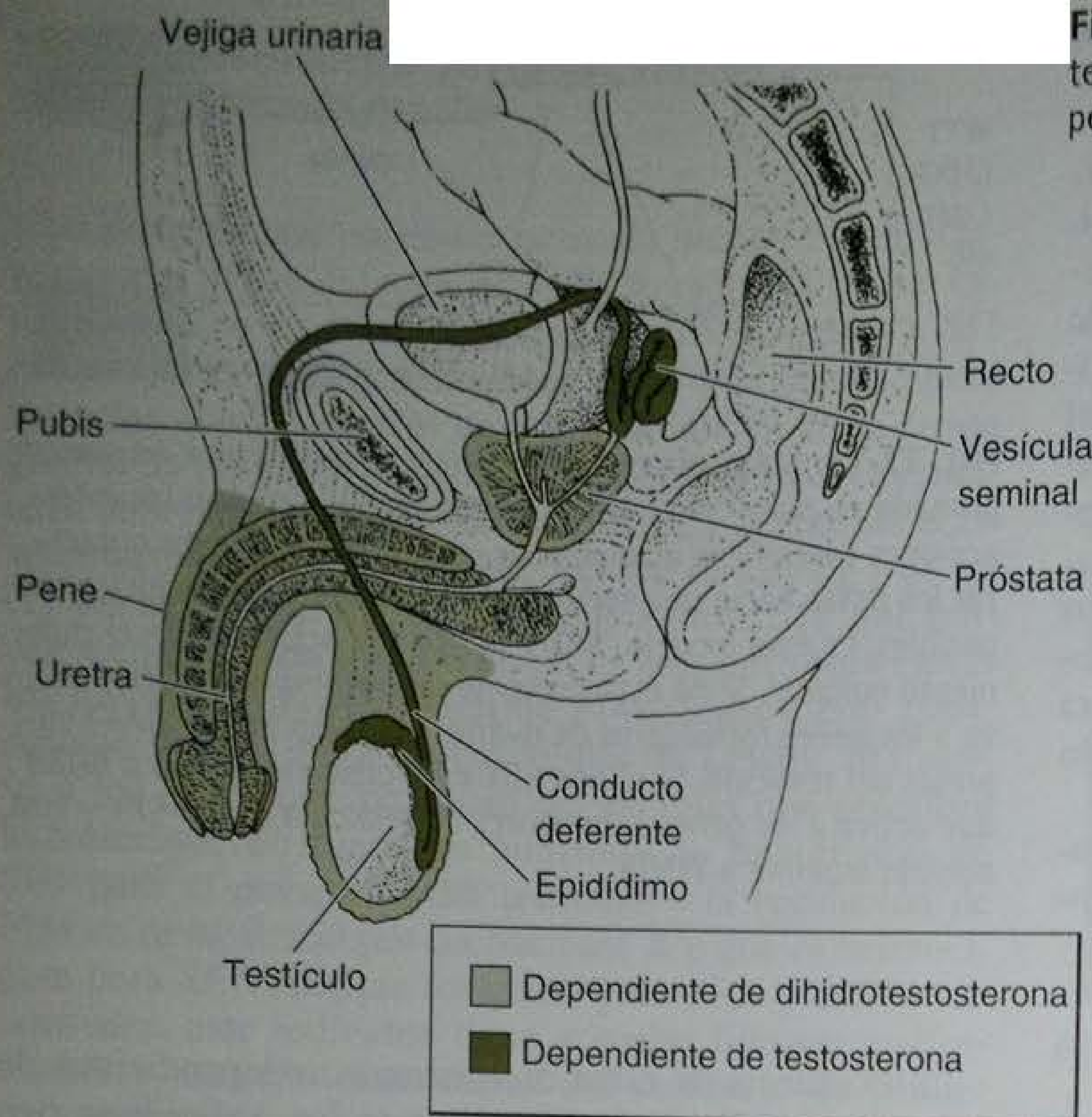


Fig. 17-13. Regiones dependientes de testosterona y dihidrotestosterona del sistema genital masculino humano. (Según Imperato-McGinley y col. 1974.)

testículos y aunque no pueden responder a la testosterona, producen y responden al FIM. Por lo tanto, sus conductos de Müller degeneran. Estos individuos se desarrollan como mujeres normales pero estériles,* carecen de útero y trompas de Falopio, y tienen testículos en su abdomen.

Testosterona y dihidrotestosterona

Aunque la testosterona es una de las dos hormonas primarias de masculinización, hay evidencia que sugiere que ésta podría no ser la hormona masculinizante activa en ciertos tejidos. La testosterona parece responsable de estimular la formación de las estructuras reproductoras masculinas (el epidídimo, las vesículas seminales y los conductos deferentes) que se desarrollan desde el primordio del conducto de Wolff. Sin embargo, ésta no masculiniza directamente a la uretra masculina, a la próstata, al pene, o al escroto. Estas funciones tardías son controladas por **5α-dihidrotestosterona (DHT**; fig. 17-13). Siiteri y Wilson (1974) demostraron que la testosterona es convertida a 5α-dihidrotestosterona en el seno urogenital y en las prominencias, pero no en el conducto de Wolff. 5α-dihidrotestosterona parece ser una hormona más potente que la testosterona.

La importancia de la 5α-dihidrotestosterona fue demostrada por Imperato-McGinley y sus colegas (1974). Ellos hallaron una pequeña comunidad de la República Dominicana en la que varios habitantes tenían una deficiencia genética de la enzima 5α-quetosteroide reductasa 2, la enzima que convierte la testosterona a DHT. Estos individuos carecen de un gen funcional para esta enzima (Andersson y col. 1991; Thigpen y col. 1992). Aunque los niños XY con este síndrome tienen testículos funcionales, tienen una bolsa vaginal ciega y un clítoris aumentado de tamaño. Ellos aparentan ser niñas y son criados como tales. Sin embargo, su anatomía interna es masculina: ellos tienen testículos, se desarrolla el conducto de Wolff y degenera el conducto de Müller. Por lo tanto, parece que la formación de los genitales externos está bajo el control de la dihidrotestosterona, mientras que la diferenciación del conducto de Wolff está controlada por la testosterona misma. Curiosamente, cuando los testículos de estos niños producen más testosterona en la pubertad, los genitales externos son capaces de responder a niveles elevados de la hormona y se diferencian. El pene aumenta de tamaño, desciende el escroto y la persona que se pensaba que originalmente iba a ser una niña demuestra ser un hombre joven.

SITIO WEB 17.3 **Dihidrotestosterona en los hombres adultos (Dihydrotestosterone in adult men).** La droga finasterida, que inhibe la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, está siendo usada para tratar el crecimiento de la próstata y los patrones de calvicie masculinos.

SITIO WEB 17.4 **Hormona tipo insulina 3 (Insulin-like hormone 3).** Además de testosterona, las células de Leydig secretan otra hormona, hormona tipo insulina 3 (Insl3). Esta hormona es requerida para el descenso

---

* El síndrome de insensibilidad a los andrógenos es una de las varias condiciones denominadas **seudohermafroditismo**. En los seudohermafroditas, hay solo un tipo de gónada, pero las características sexuales secundarias difieren de las que deberían ser esperadas de la gónada sexual. En los seres humanos, los seudohermafroditas masculinos (en los cuales la gónada sexual es masculina y las características sexuales secundarias son femeninas) pueden ser causados por mutaciones en el receptor de andrógenos (testosterona) o por mutaciones que afectan la síntesis de testosterona (Geissler y col. 1994). El seudohermafroditismo en las mujeres (en las que la gónada sexual es femenina pero el individuo es, en apariencia, masculino) puede ser causado por sobreproducción de andrógenos en el ovario o en la glándula suprarrenal. La causa más común de esta condición es la hiperplasia suprarrenal congénita, en la que hay una deficiencia genética de una enzima que metaboliza los esteroides de cortisol en la glándula suprarrenal. Ante la ausencia de esta enzima, los esteroides tipo testosterona se acumulan y pueden unirse al receptor de andrógeno para masculinizar al feto (Migeon y Wisniewski 2001; Merke y col. 2002). Por lo tanto, el seudohermafroditismo es debido a anomalías de la determinación sexual *secundaria*.

Los hermafroditas "verdaderos" contienen tejido gonadal masculino y femenino. Por lo tanto, en los mamíferos, ellos son el resultado de anomalías de determinación sexual *primaria*. Los hermafroditas verdaderos pueden producirse, por ejemplo, cuando un cromosoma Y es translocado a un cromosoma X. En los tejidos donde el Y translocado está sobre el cromosoma X activo, el cromosoma Y será activo y el gen *SRY* será transcrito; en las células donde el cromosoma Y está sobre el cromosoma X inactivo, el cromosoma Y será inactivo (Berkovitz y col. 1992; Margarit y col. 2000).

de las gónadas hacia el escroto. Los machos que carecen de esta hormona son infértiles debido a que los testículos no descienden. En las hembras, la ausencia de esta hormona desregula el ciclo menstrual.

Factor inhibidor del conducto de Müller

El factor inhibidor de Müller (FIM), un miembro de la familia de los factores de crecimiento y diferenciación TGF-β, es secretado desde las células de Sertoli y causa la degeneración del conducto de Müller (Tran y col. 1977; Cate y col. 1986). Cuando se colocan fragmentos de testículos fetales o células de Sertoli aisladas adyacentes a segmentos de tejidos cultivados que contienen porciones de conductos de Wolff y de Müller, el conducto de Müller se atrofia incluso aunque no se produzcan cambios en el conducto de Wolff (fig. 17-14). Se piensa que el FIM se une a las células mesenquimáticas que rodean al conducto de Müller y hacen que las células secreten un factor paracrino que induce la apoptosis en el epitelio del conducto de Müller (Trelstad y col. 1982; Roberts y col. 1999).

SITIO WEB 17.5 **Papeles del FIM (Roles of AMH).** El FIM puede tener otros papeles en la determinación del sexo además de causar la desaparición de los conductos de Müller. Éste puede causar inversión sexual en algunos mamíferos y puede llegar a ser útil como fármaco antitumoral.

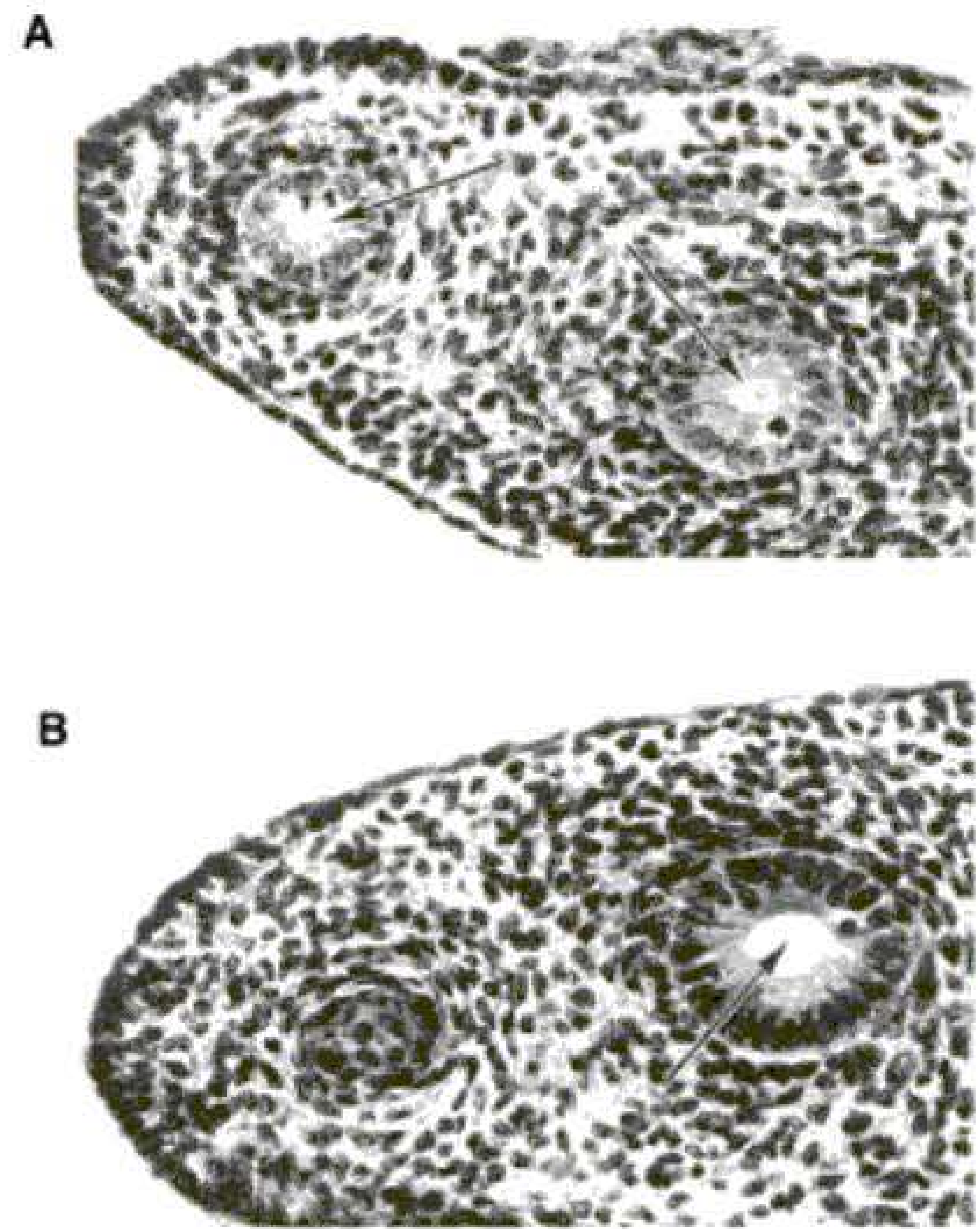


Fig. 17-14. Ensayo para la actividad de FIM en el segmento anterior de un tracto reproductivo de rata fetal de 14,5 días. **A.** Al comienzo del experimento, el conducto de Müller (flecha a la izquierda) y el conducto de Wolff (flecha a la derecha) están abiertos. **B.** Después de 3 días en cultivo con tejido que secreta FIM, el conducto de Wolff (flecha) está abierto, pero el conducto de Müller ha degenerado y se ha cerrado. (Microfotografía cortesía de N. Josso.)

Estrógeno

El estrógeno es necesario para completar el desarrollo de los conductos de Müller y de Wolff. En las hembras, el estrógeno secretado desde los ovarios fetales parece ser suficiente para inducir la diferenciación del conducto de Müller hacia sus diversos componentes: el útero, las trompas de Falopio y el cuello uterino. La sensibilidad extrema del conducto de Müller a los componentes estrogénicos es demostrada por los efectos teratogénicos del **dietilestilbestrol (DES)**, un poderoso estrógeno sintético que puede causar esterilidad al cambiar el patrón del conducto de Müller (véase cap. 21). En ratones, DES puede hacer que el epitelio de la trompa de Falopio (oviducto) adopte la apariencia del útero y que el epitelio uterino se asemeje al cuello uterino (Ma y col. 1998)

El estrógeno es necesario para la fecundidad de los machos y de las hembras. En las ratonas hembras con knockouts de los receptores de estrógeno, las células germinales mueren en el adulto y las células de la granulosa que han formado una envoltura alrededor de ellas comienzan a desarrollarse como células de Sertoli (Couse y col. 1999). En los ratones machos con knockouts de los receptores de estrógeno, se producen pocos espermatozoides. Una de las funciones de las células del conducto eferente es absorber cerca del 90% del agua desde el lumen de la rete testis. Esta absorción del agua, que es regulada por estrógeno, concentra los espermatozoides, otorgándoles una larga vida útil y proporcionando más espermatozoides por eyaculado. Si el estrógeno o su receptor está ausente en los ratones, esta agua no es absorbida y el ratón es estéril (Hess y col. 1997). Mientras que las concentraciones sanguíneas de estrógenos son más elevadas en las hembras que en los machos, la concentración de estrógeno en la rete testis es aún más elevada que la de la sangre de la hembra.

SITIO WEB 17.6 **Los mecanismos de desarrollo mamario (The mechanisms of breast development).** El tejido mamario tiene un modo de desarrollo sexualmente dimórfico. La testosterona inhibe el desarrollo mamario, mientras que los estrógenos lo estimulan. La mayoría del desarrollo mamario se lleva a cabo después del nacimiento y diferentes hormonas actúan durante la pubertad y el embarazo para provocar el aumento del tamaño y diferenciación mamario.

Información adicional y especulaciones

Determinación y conductas sexuales

La hipótesis de la organización/activación

¿Impone la exposición prenatal (o neonatal) a hormonas esteroides particulares cambios permanentes específicos de sexo sobre el sistema nervioso central? Tales cambios neurales específicos de sexo han sido demostrados en regiones del cerebro que regulan la fisiología sexual "involuntaria". La secreción cíclica de hormona luteinizante por la hipófisis en una hembra adulta, por ejemplo, es dependiente de la ausencia de testosterona durante la primera semana de vida del animal. La secreción de hormona luteinizante de las ratas hembras puede hacerse monocíclica al darles testosterona 4 días después del nacimiento. Por el contrario, la secreción de hormona luteinizante de los machos puede hacerse cíclica al extirpar sus testículos dentro del primer día de vida (Barraclough y Gorski 1962). Se piensa que las hormonas sexuales pueden actuar durante la vida fetal o en el estadio neonatal de la vida del mamífero para organizar el sistema nervioso de un modo específico de sexo, y que durante la vida adulta, las mismas hormonas pueden tener efectos activadores transitorios. Esta idea es denominada la **hipótesis de la organización/activación**.

Cabe destacar que la principal hormona responsable de la determinación del patrón neural del macho es el **estradiol**, un tipo de estrógeno.* La testosterona en la sangre fetal o neonatal puede convertirse en estradiol por la enzima **aromatasa P450**. Esta conversión se produce en el hipotálamo y en el sistema límbico –dos áreas del cerebro que se sabe regulan la secreción hormonal y la conducta reproductiva (Reddy y col. 1974; McEwen y col. 1977). Por lo tanto, la testosterona ejerce sus efectos sobre el sistema nervioso siendo convertida hacia estradiol en el cerebro. Pero el ambiente fetal es rico en estrógenos de las gónadas y de la placenta. ¿Qué detiene a estos estrógenos a masculinizar el sistema nervioso de un feto hembra? El estrógeno fetal (en machos y hembras) es unido por **α-fetoproteína**. Esta proteína es producida en el hígado fetal y llega a ser el principal componente de la sangre fetal y del líquido cefalorraquídeo; se unirá e inactivará al estrógeno, pero no a la testosterona.

Los intentos de extender la hipótesis de la organización/activación hacia conductas sexuales "voluntarias" son más polémicos, debido a que no hay una conducta específica de sexo verdadera que distinga a los dos sexos de muchos mamíferos, y a que el tratamiento hormonal tiene múltiples efectos sobre los mamíferos en desarrollo. Por ejemplo, la inyección de testosterona en una rata hembra de una semana de edad incrementará la conducta de empujar la pelvis y disminuirá la lordosis –una postura receptiva que estimula en el macho el comportamiento para montar– cuando ella alcanza la edad adulta (Phoenix y col. 1959; Kandel y col. 1995). Estos cambios de conducta pueden ser atribuidos a cambios mediados por testosterona en el sistema nervioso central, pero también pueden deberse a efectos hormonales sobre otros tejidos. La testosterona facilita el crecimiento de los músculos que permiten el empuje pélvico. Y debido a que la testosterona hace que las hembras crezcan en tamaño y hace que sus orificios vaginales se cierren, no se puede concluir que la falta de lordosis es debida solamente a cambios mediados por testosterona en el circuito neural (Harris y Levine 1965; De Jonge y col. 1988; Moore y col. 1992; Fausto-Sterling 1995). Además, los efectos de los esteroides sexuales sobre el cerebro son muy complicados y los esteroides pueden ser metabolizados de modo diferente en las distintas regiones del cerebro. Los ratones macho, que carecen del receptor de testosterona, todavía retienen una morfología preóptica específica de macho en el cerebro y los ratones machos que carecen de la enzima aromatasa son capaces de producir crías (Breedlove 1992; Fisher y col. 1998).

Estos estudios demuestran que hay más morfología y conducta específica de sexo que hormonas esteroideas. Aun cuando los libros de gran éxito en ventas pretenden conocer las respuestas, se tiene que aprender mucho más considerando las relaciones entre desarrollo, esteroides y comportamiento. Además, la extrapolación desde ratas a humanos es un negocio muy riesgoso, cuando todavía no han sido identificadas en los seres humanos conductas específicas de sexo y lo que es "masculino" en una cultura puede ser considerado "femenino" en otra (véase Jacklin 1981; Bleier 1984; Fausto-Sterling 1992). Como una revisión concluyó (Kandel y col. 1995):

> *Hay abundante evidencia en la que la organización neural de las conductas reproductivas, mientras son influenciados de modo importante por acontecimientos hormonales durante un período prenatal crítico, no ejerce una influencia inmutable sobre la conducta sexual adulta o incluso sobre una orientación sexual del individuo. Dentro de la vida de un individuo, los motivos religiosos, sociales o psicológicos pueden impulsar a personas biológicamente similares a divergir ampliamente en sus actividades sexuales.*

Homosexualidad masculina

Se dice con frecuencia que ciertas conductas son parte de un fenotipo "completo", masculino o femenino. Se dice que el cerebro de un hombre maduro se forma de modo tal que lo lleva a desear aparearse con una mujer madura, y el cerebro de una mujer madura la lleva a desear aparearse con un hombre maduro. Sin embargo, tan importante como los deseos en nuestras vidas, ellos no pueden ser detectados por hibridación in situ o aislados por anticuerpos monoclonales. Todavía no se conoce si los deseos sexuales son principalmente infundidos en nosotros o por nuestra educación social, o son "impresos" fundamentalmente en nuestros cerebros durante nuestro

* Los términos *estrógeno* y *estradiol* con frecuencia se utilizan de modo intercambiable. Sin embargo, estrógeno se refiere a una clase de hormonas esteroideas responsables (entre otras funciones) del establecimiento y mantenimiento de las características femeninas específicas. El estradiol es una de estas hormonas y en la mayoría de los mamíferos (incluidos los seres humanos) es el más potente de los estrógenos.

desarrollo intrauterino por genes u hormonas o por otros medios.

En 1991, Simon LeVay propuso que parte del hipotálamo anterior de los hombres homosexuales tiene la forma anatómica típica de las mujeres en lugar de la de los hombres heterosexuales. Se piensa que el hipotálamo es la fuente de nuestros impulsos sexuales y las ratas tienen un área sexualmente dimórfica en el hipotálamo anterior que parece regular su conducta sexual. Por lo tanto, este estudio –que fue basado en observaciones de hipotálamos humanos extirpados y disecados postmortem– generó mucha publicidad y discusión. En la figura 17-15 se muestran sus principales resultados. Los núcleos intersticiales (grupos de neuronas) del hipotálamo anterior (INAH, del inglés, *interstitial nuclei of the anterior hypothalamus*) fueron divididos en cuatro regiones. Tres de ellas no mostraron signos de dimorfismo sexual. Sin embargo, una de ellas, INAH3, mostró una diferencia estadísticamente significativa en el volumen entre los machos y las hembras. El estudio encontró que los INAH3 de macho eran, en promedio, más del doble de grandes que los INAH3 de la hembra. Además, los datos de LeVay's sugirieron que los INAH3 del hombre homosexual eran similares en volumen a los de la mujer; menos de la mitad de tamaño de los INAH3 en el hombre heterosexual. Este hallazgo, LeVay afirmó, "sugiere que la orientación sexual tiene un sustrato biológico".

Se hicieron severas críticas de la interpretación de LeVay sobre estos resultados. En primer lugar, la conclusión es de poblaciones, no de individuos; uno puede discutir que hay un rango estadístico y que el hombre y la mujer tienen el mismo rango general. (En efecto, uno de los INAH3 de un hombre "homosexual" fue el más grande de todos excepto uno de aquellos de los 16 hombres "heterosexuales en estudio.) En segundo lugar, los "hombres heterosexuales" no eran necesariamente heterosexuales, ni los "hombres homosexuales" eran necesariamente homosexuales: los cerebros provenían de cadáveres de personas cuyas preferencias sexuales no fueron definitivamente conocidas. La homosexualidad tiene muchas formas, y probablemente no tiene un único fenotipo. Los cerebros de los que se presuponía eran "hombres homosexuales" fueron tomados de pacientes que murieron de SIDA, lo que trae una tercera cuestión: el SIDA afecta el cerebro y no son conocidos sus efectos sobre las neuronas hipotalámicas.

En cuarto lugar, debido a que el estudio fue realizado sobre sujetos muertos, no se puede inferir causa y efecto. Tales datos solamente muestran correlaciones, no causalidad. Es tan probable que las conductas puedan afectar la densidad neuronal regional tanto como la densidad neuronal regional puede afectar las conductas. Si se interpretan los datos como indicando que los INAH3 de los hombres homosexuales son más pequeños que los de los hombres heterosexuales, todavía no se sabe si es una causa de la homosexualidad o el resultado de ésta. En efecto, Breedlove (1997) ha demostrado que la densidad y tamaño de ciertas neuronas en el ganglio espinal de la rata dependen de la frecuencia de relaciones sexuales. En este caso, la conducta afectó a las neuronas. En quinto lugar, incluso si existe una diferencia en los INAH3, no hay evidencia de que la diferencia tenga algo que ver con la sexualidad. En sexto lugar, estos estudios no indican cuándo surgen tales diferencias (si ellas existen). La pregunta de si las diferencias de los INAH3 entre los hombres heterosexuales, mujeres y hombres homosexuales son establecidas durante el desarrollo embrionario, poco tiempo después del nacimiento, durante los primeros años de vida, durante la adolescencia, o en algún otro momento, no ha sido estudiada.

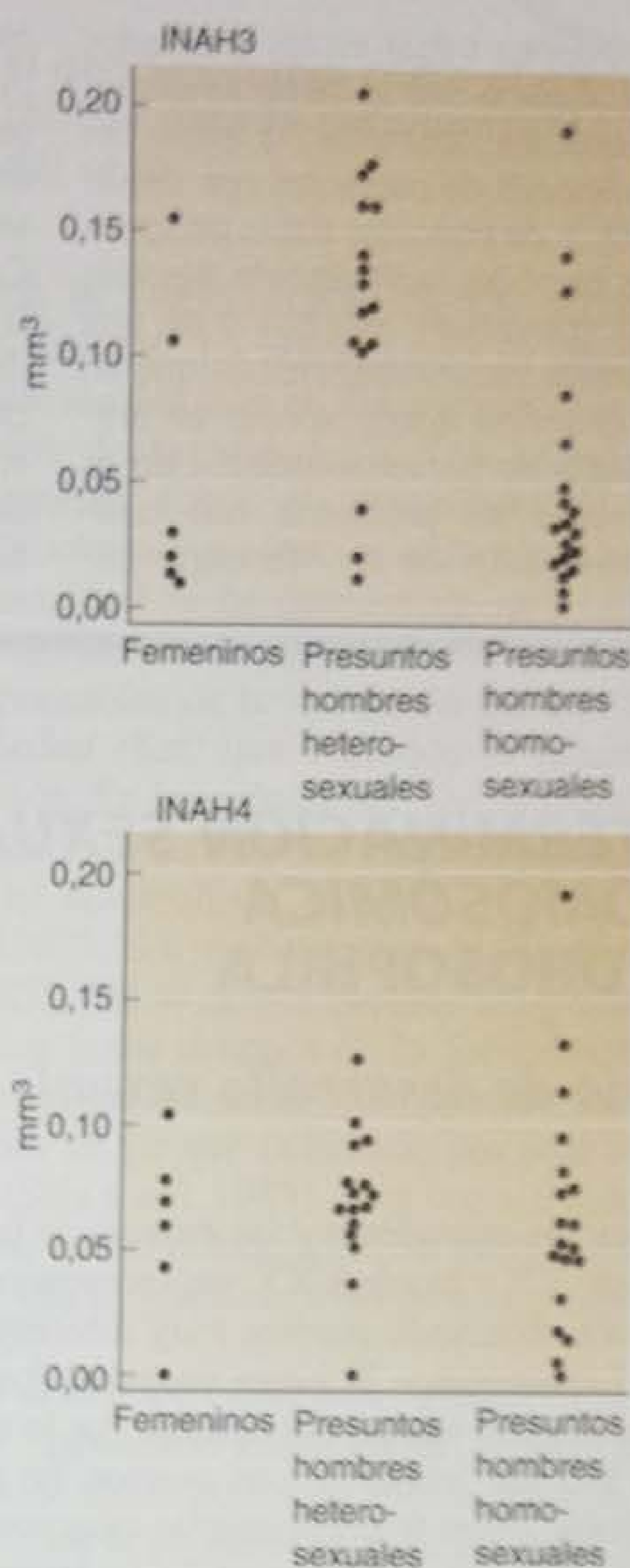


Fig. 17-15. Una parte de los datos sugiere una base biológica para la homosexualidad. INAH4 e INAH3 son dos grupos de neuronas hipotalámicas. INAH4 no muestra dimorfismo sexual en volumen, mientras que INAH3 muestra un agrupamiento estadísticamente significativo, aunque el rango es similar. Las INAH3 de autopsias de cerebros de hombres presuntamente homosexuales se agrupan hacia una distribución femenina. (Según LeVay 1991.)

En 1993, se hizo una correlación entre una secuencia particular sobre el cromosoma X y un subgrupo particular de hombres homosexuales: los hombres homosexuales que tenían un hermano homosexual. De cuarenta pares de hermanos homosexuales, en los cuales un hermano había heredado una región particular del cromosoma X de su madre, el otro hermano también había heredado esta región en 33 casos (Hamer y col. 1993). Uno debería esperar que ambos hermanos hubieran hecho esto en solo 20 casos, como promedio. Otra vez, ésta es solo una concordancia estadística y una que puede ser coincidente. Además, el control (la incidencia del mismo marcador en los hombres "no homosexuales" de estas familias) no fue reportado, y la tendencia estadística de las observaciones ha sido puesta en duda, especialmente desde que otros laboratorios no han sido capaces de repetir el resultado (Risch y col. 1993; Marshall 1995). Estudios más recientes (Hu y col. 1995; Rice y col. 1999) hallaron poco o nada de incremento en la incidencia de esta secuencia de DNA cuando los hombres homosexuales fueron comparados con sus hermanos no homosexuales. Hu y col. concluyeron que esta secuencia "no es necesaria ni suficiente para una orientación homosexual." Por lo tanto, a pesar de los informes de estos estudios en el medio público, no ha sido hallado un "gen homosexual."

Los genes codifican RNA y proteínas, no conductas. Mientras que los

genes pueden influir en los resultados de la conducta, no se tiene evidencia sobre qué los "controla" a ellos. Las observaciones de pacientes con esquizofrenia, o de personas cuyas personalidades cambian radicalmente después de una conversión religiosa o de una experiencia traumática, indican que un único genotipo puede apoyar un amplio rango de personalidades. Esto es ciertamente un problema con cualquier definición de un "fenotipo homosexual," debido a que la gente puede alternar entre conducta homosexual y heterosexual, y la definición de qué constituye la conducta homosexual difiere entre las culturas (véase Carroll y Wolpe 1996). Por lo tanto, si la dirección del deseo sexual es indicada o influida por genes dentro del núcleo, por hormonas sexuales durante el desarrollo fetal, o por experiencias después del nacimiento es todavía un asunto abierto.

SITIO WEB 17.7 **Sexualidad y el sistema nervioso central (Sex and the central nervous system).** Hay abundante evidencia de que los estrógenos y la testosterona pueden causar cambios en el sistema nervioso central. Las aves parecen especialmente susceptibles a cambios hormonalmente inducidos en su conductas.

DETERMINACIÓN SEXUAL CROMOSÓMICA EN DROSOPHILA

La vía de desarrollo sexual

Aunque los mamíferos y las moscas de la fruta producen hembras XX y machos XY, sus cromosomas alcanzan estos fines utilizando medios muy diferentes. En mamíferos, el cromosoma Y juega un papel fundamental en la determinación sexual del macho. Por lo tanto, los mamíferos XO son hembras, con ovarios, un útero y trompas de Falopio (pero frecuentemente muy poco, o ningún, gameto femenino). En *Drosophila*, la determinación del sexo es llevada a cabo mediante un balance de los determinantes femeninos sobre el cromosoma X y de los determinantes masculinos sobre los autosomas. Normalmente, las moscas tienen uno o dos cromosomas X y dos grupos de autosomas. Si hay un cromosoma X menos en una célula diploide (1X:2A), la mosca es macho. Si hay dos cromosomas X en una célula diploide (2X:2A), la mosca es hembra (Bridges 1921, 1925). En las moscas, el cromosoma Y no está involucrado en la determinación sexual. En su lugar, éste contiene genes que son activos en la formación de espermatozoides en los adultos. Por lo tanto, las *Drosophilas* XO son machos estériles. El cuadro 17-1 muestra las diferentes proporciones posibles de X-autosomas para *Drosophila* y el sexo resultante.

En *Drosophila* y en insectos en general, se pueden observar **ginandromorfos** –animales en los que ciertas regiones del cuerpo son macho y otras regiones son hembra (fig. 17-16). Esto puede suceder cuando se pierde un cromosoma X de un núcleo embrionario. Las células que descienden de esta célula, en lugar de ser XX (hembra), son XO (macho). Debido a que no hay hormonas sexuales en insectos que integren el fenotipo para la totalidad del cuerpo, cada célula toma su propia "decisión" sexual. Las células XO muestran características de macho, mientras que las células XX muestran caracteres de hembra. Esta situación proporciona un bello ejemplo de asociación entre cromosomas X de insecto y sexo.

Cualquier teoría de la determinación sexual de *Drosophila* debe explicar cómo es "leída" la proporción de X-autosomas (X:A) y de cómo esta información es transmitida a los genes que controlan los fenotipos de macho o de hembra (Cline 1993). Como se verá, el cromosoma X y los autosomas producen factores de transcripción que activan o reprimen al gen *Sex-lethal*, respectivamente. Si hay dos cromosomas X, los factores de transcripción que son codificados por aquellos cromosomas pre-

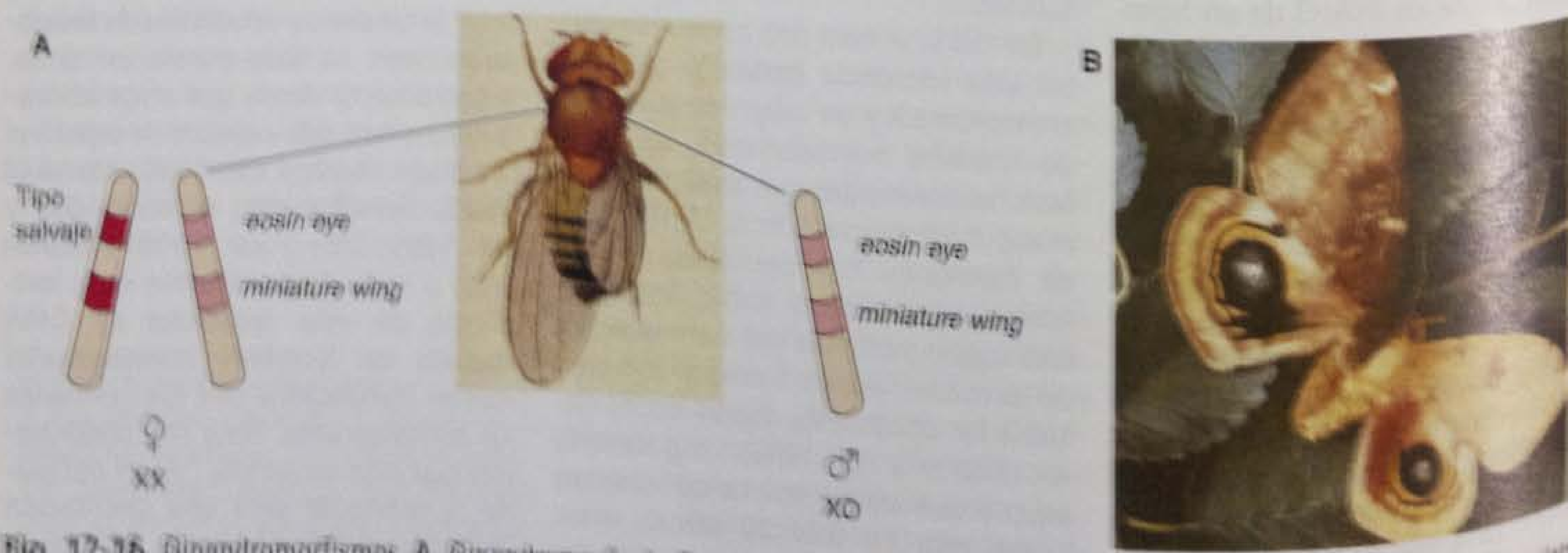


Fig. 17-16. Ginandromorfismos. **A.** Ginandromorfo de *D. melanogaster* en la cual el lado izquierdo es femenino (XX) y el lado derecho es masculino (XO). El lado masculino ha perdido su cromosoma X que porta los alelos tipo salvaje del color del ojo y de la forma del ala, y permite de este modo la expresión de los alelos recesivos *eosin eye* y *miniature wing* sobre el cromosoma X remanente. **B.** Fotografía de una polilla ginandromórfica Io, dividida bilateralmente en una mitad femenina marrón rosada y una mitad masculina más pequeña y amarilla. (A, de Morgan y Bridges

Cuadro 17-1 *Proporciones de cromosomas X con relación a los autosomas en diferentes fenotipos sexuales en* Drosophila melanogaster

Cromosomas X	*Grupos de autosomas*	*Proporción (A)X:A*	*Sexo*
3	2	1,50	Metahembra
4	3	1,33	Metahembra
4	4	1,00	Hembra normal
3	3	1,00	Hembra normal
2	2	1,00	Hembra normal
2	3	0,66	Intersexo
1	2	0,50	Macho normal
1	3	0,33	Metahembra

Fuente: Según Strickberger 1968.

valecen sobre los represores transcripcionales codificados por los autosomas. El gen *Sex-lethal* es de este modo activado. El producto de este gen luego actúa como un factor de procesamiento de RNA que permite la síntesis de ciertas proteínas. Estas proteínas, a su vez, actúan como factores de procesamiento del RNA para modificar el RNA nuclear (pre-mRNA) del gen *doublesex*. Dependiendo de cómo es empalmado el RNA de *doublesex*, se pueden formar dos tipos de proteínas Doublesex. La proteína Doublesex de hembra se forma en aquellas moscas donde dos cromosomas X han activado al gen *Sex-lethal*; la proteína Doublesex del macho se forma en aquellas moscas donde los autosomas han evitado la activación del gen *Sex-lethal*. Las proteínas Doublesex están involucradas en la producción del fenotipo sexual de la mosca.

Mecanismos de determinación del sexo

La investigación en las dos décadas pasadas ha revolucionado nuestra visión de la determinación sexual de *Drosophila*. Se han hallado varios genes con papeles en la determinación sexual. Las mutaciones de pérdida de función en la mayoría de los genes –*Sex-lethal* (*Sxl*), *transformer* (*tra*) y *transformer-2* (*tra2*)– transforman a los individuos XX en machos. Tales mutaciones no tienen efectos sobre la determinación en machos XY. La homocigosidad del gen *intersex* (*ix*) hace que las moscas XX desarrollen un fenotipo intersexo que tiene porciones de tejido de macho y de hembra en el mismo órgano. El gen *doublesex* (*dsx*) es importante para la diferenciación sexual de ambos sexos. Si *dsx* está ausente, las moscas XX y XY se convierten en intersexos (Baker y Ridge 1980; Belote y col. 1985a). El posicionamiento de estos genes en una vía de desarrollo está basado en 1) la interpretación de los cruces genéticos que resultan en moscas portadoras de dos o más mutaciones de estos genes y 2) la determinación de lo que sucede cuando hay una ausencia completa de los productos de uno de estos genes. Tales estudios han generado el modelo de cascada regulatoria observada en la figura 17-17.

El gen Sex-lethal como el eje central para la determinación del sexo

LA INTERPRETACIÓN DE LA PROPORCIÓN X:A. La primera fase de determinación del sexo en *Drosophila* es la lectura de la proporción X:A. ¿Qué elementos sobre el cromosoma X son "contados" y cómo se utiliza esta información? Se ha demostrado que valores elevados de la proporción X:A son responsables de la activación del gen ***Sex-lethal*** **(*Sxl*)** que enciende la feminización. En las células XY, *Sxl* se mantiene inactivo durante los estadios tempranos del desarrollo (Cline 1983; Salz y col. 1987). Sin embargo, en la *Drosophila* XX, *Sxl* se activa durante las primeras dos horas después de la fecundación y este gen transcribe un tipo embrionario particular de mRNA de *Sxl* que es hallado por solo cerca de dos horas más (Salz y col. 1989). Una vez activado, el gen *Sxl* se mantiene activo debido a que su producto proteico es capaz de unirse y activar a su propio promotor (Bell y col. 1991).

Se piensa que la activación específica de hembra de *Sxl* es estimulada por "**proteínas numerador**" codificadas por el cromosoma X. Estas proteínas son la parte X (es decir, el numerador) de la proporción X:A. Las proteínas numerador se unen al promotor "temprano" del gen *Sxl* para estimular la transcripción poco después de la fecundación. Cline (1988) ha demostrado que estas proteínas incluyen a Sisterless-a y Sisterless-b. Las "**proteínas denominador**" son proteínas codificadas autosómicamente tales como Deadpan y Extramacrochaetae. Estas proteínas bloquean la unión o actividad de las proteínas numerador (Van Doren y col. 1991; Younger-Shepherd y col. 1992). Las proteínas denominador pueden en realidad ser capaces de formar heterodímeros inactivos con las proteínas numerador (fig. 17-18). Parece entonces, que la proporción X:A es medida por la competición entre los activadores codificados por X y los represores codificados autosómicamente del promotor temprano del gen *Sxl*.

MANTENIMIENTO DE LA FUNCIÓN DE SXL. Poco tiempo después de que ha tenido lugar la transcripción inicial de *Sxl*, se activa un segundo promotor "tardío" sobre el gen *Sex-lethal* y el gen ahora es transcrito en machos y hembras. Sin embargo, el análisis del cDNA de mRNA de *Sxl* muestra que el mRNA de *Sxl* de los machos difiere del mRNA de *Sxl* de las hembras (Bell y col. 1988). Esta diferencia es el resultado del procesamiento diferencial del RNA. Además, la proteína Sxl parece unirse a su propio precursor de mRNA para empalmarlo en el modo de hembra. Debido a que los machos no tienen proteína Sxl *viable* cuando se activa el promotor tardío, sus nuevos transcritos de *Sxl* son procesados en el modo de macho (Keyes y col. 1992). El mRNA de *Sxl* del macho no es funcional. Mientras que el mensajero de *Sxl* específico de la hembra codifica una proteína de 354 aminoácidos, el transcrito de *Sxl* específico del macho contiene un codón

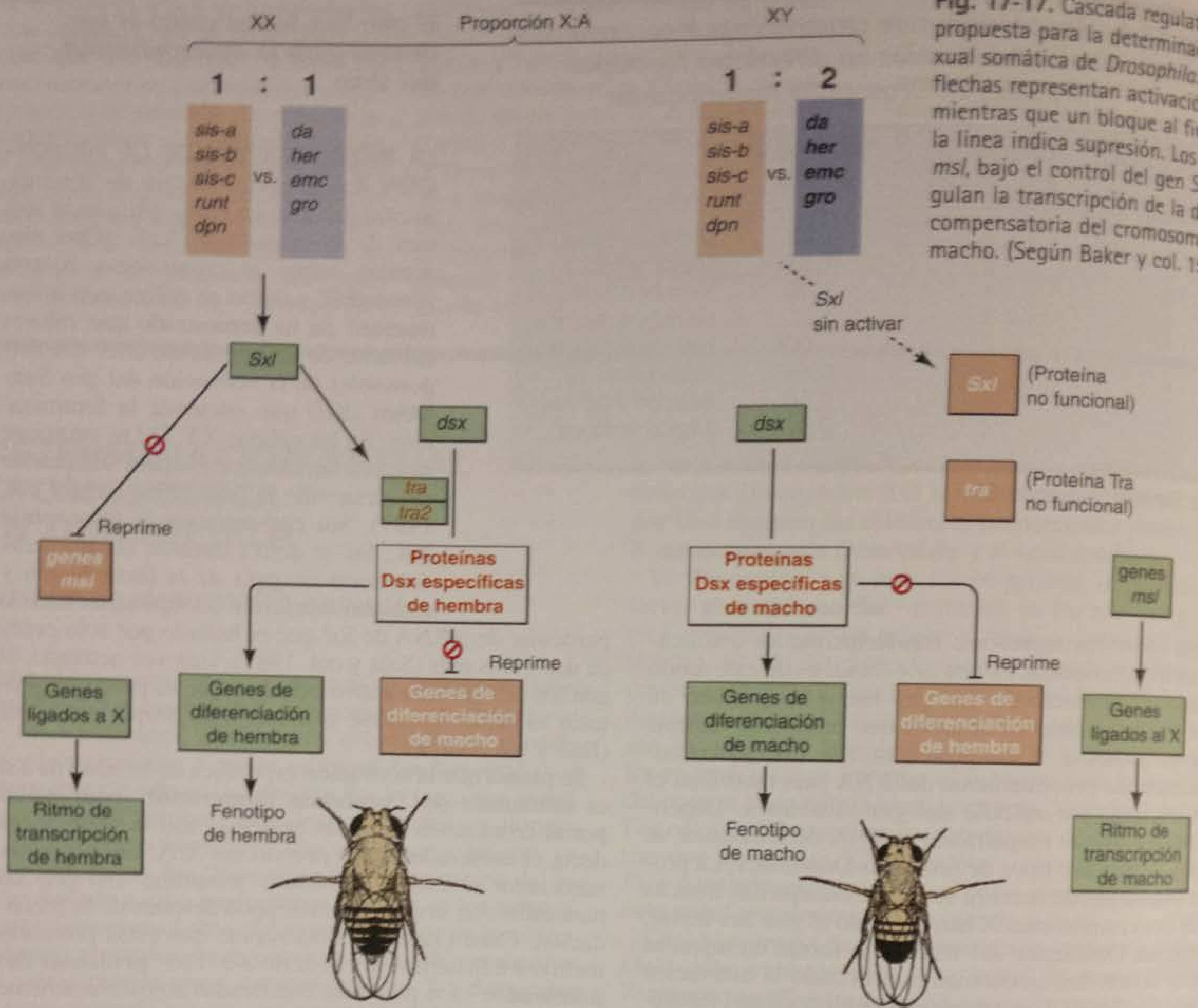


Fig. 17-17. Cascada regulatoria propuesta para la determinación sexual somática de *Drosophila*. Las flechas representan activación, mientras que un bloque al final de la línea indica supresión. Los loci *msl*, bajo el control del gen *Sxl*, regulan la transcripción de la dosis compensatoria del cromosoma X del macho. (Según Baker y col. 1987.)

de terminación de la traducción (UGA) después del aminoácido 48. El procesamiento diferencial del RNA que incluye este codón de terminación en el mRNA específico del macho se muestra en las figuras 17-18B y 17-19. En los machos, el transcrito nuclear es empalmado en un modo que produce ocho exones y el codón de terminación está dentro del exón 3. En hembras, el procesamiento del RNA produce solamente siete exones y es eliminado el exón 3 específico del macho como parte de un intrón de mayor tamaño. Por lo tanto, el mRNA específico de la hembra carece del codón de terminación. La proteína generada por el transcrito *Sxl* específico de la hembra contiene regiones que son importantes para la unión al RNA. Parece que hay dos blancos principales al RNA a los que se une el transcrito *Sxl* específico de la hembra. Uno de éstos es el pre-mRNA del mismo *Sxl*; el otro blanco es el pre-mRNA de *transformer* –el siguiente gen sobre la vía (Bell y col. 1988; Nagoshi y col. 1988).

SITIO WEB 17.8 **Otras proteínas de determinación del sexo en *Drosophila* (Other sex determination proteins in *Drosophila*).** Sex-lethal no trabaja solo, sino en coordinación con varias proteínas cuya presencia es esencial para su función. Muchas de estas proteínas tienen otros papeles durante el desarrollo.

Los genes transformer

El gen *Sxl* regula la determinación sexual somática mediante el control del procesamiento del transcrito del gen *transformer* (***tra***) (transformador). El pre-mRNA *tra* es empalmado alternativamente para crear un mRNA específico de la hembra como también un mRNA no específico que es hallado en las hembras y en los machos. Como el mensajero *Sxl* del macho, el mRNA de *tra* no específico contiene un codón de terminación temprano en el mensajero, lo que hace a la proteína no funcional (Boggs y col. 1987). En *tra*, el segundo exón del mRNA no específico contiene el codón de terminación. Este exón no es utilizado en el mensajero específico de la hembra (véase fig. 17-19).

¿Cómo hace la hembra para producir un transcrito diferente al del macho? En las hembras, la proteína Sxl específica de la hembra activa a un sitio de empalme 3' en el pre-mRNA de *transformer*, haciendo que éste sea procesado en un sentido en el que es eliminado el segundo exón. Para hacerlo, la proteína Sxl bloquea la unión del factor de empalme U2AF al sitio de empalme no específico del mensajero de *tra* mediante la unión específica a la extensión de polipirimidina adyacente a éste (fig. 17-20; Handa y col. 1999). Esto hace que U2AF se una al sitio de empalme 3' de afinidad más baja (específico de hem-

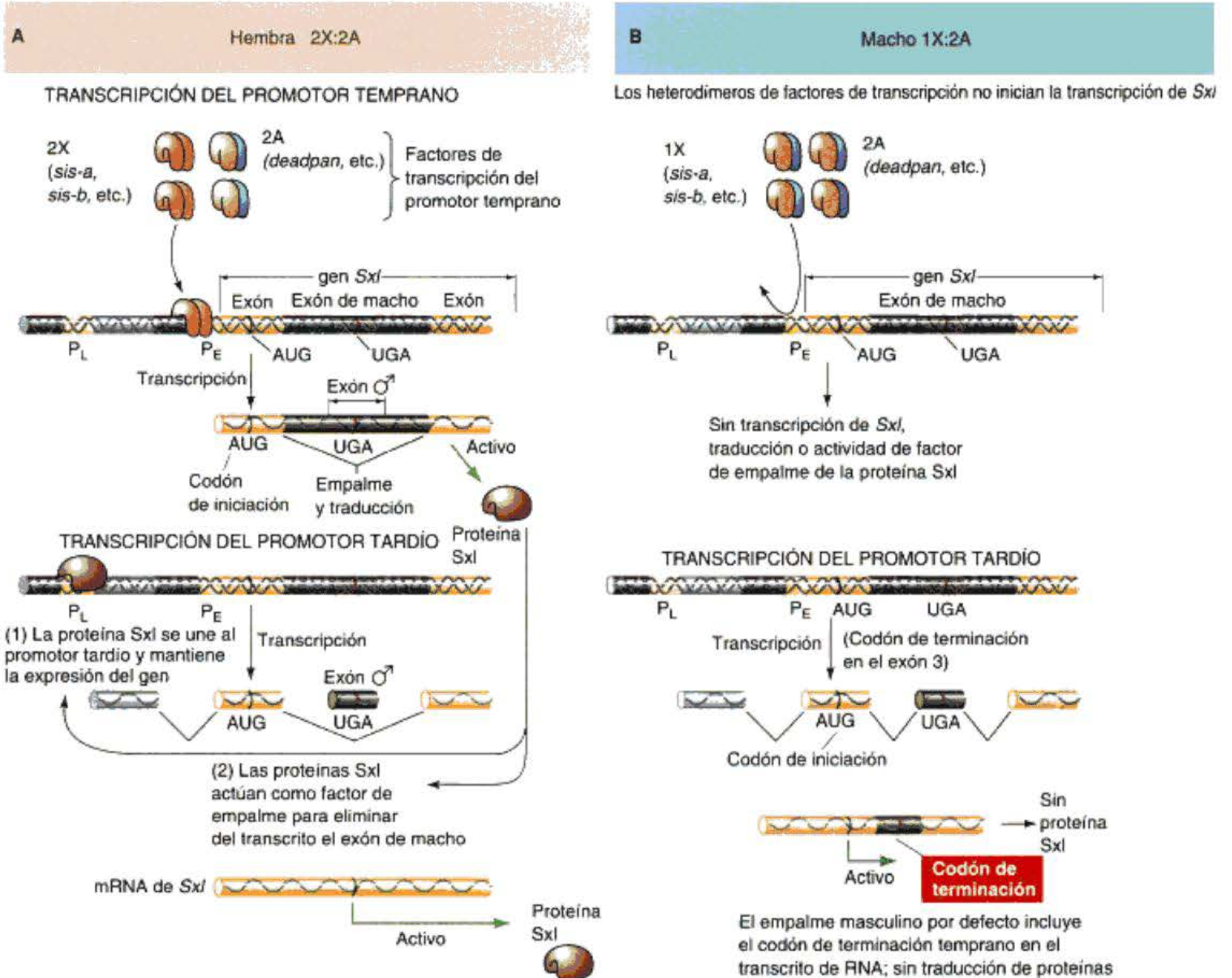


Fig. 17-18. Activación diferencial del gen *Sxl* en las hembras y en los machos. **A.** En *Drosophila* tipo salvaje con dos cromosomas X y dos grupos de autosomas (2X:2A), las proteínas del "numerador" codificadas sobre los cromosomas X (Sis-a, Sis-b, etc.) no son todas unidas por las proteínas inhibitorias del "denominador" derivadas de los genes sobre los autosomas (como *deadpan*). Las proteínas numerador activan al promotor temprano (P_E) del gen *Sxl*. En los machos y hembras, la transcripción constitutiva de *Sxl* comienza finalmente desde el promotor tardío (P_L). Si la proteína Sxl es realmente viable (es decir, desde la transcripción temprana), el pre-mRNA de *Sxl* es empalmado para formar el mensajero funcional específico de hembra. **B.** En *Drosophila* tipo salvaje con un cromosoma X y dos grupos de autosomas (1X:2A), las proteínas numerador son unidas por las proteínas denominador y no pueden activar al promotor temprano. Cuando el gen *Sxl* es transcrito desde el promotor tardío, el empalme del RNA no excluye al exón específico del macho en el mRNA. El mensajero resultante codifica un péptido truncado y no funcional, debido a que el exón específico del macho contiene un codón de terminación de la traducción. (Según Keyes y col. 1992.)

bra) y genere un mRNA específico de hembra (Valcárcel y col. 1993). El producto de Tra específico de hembra actúa en coordinación con el producto de gen *transformer-2* (*tra2*) para ayudar a generar el fenotipo femenino.

Doublesex: *el gen que activa la determinación sexual*

El gen *doublesex* (*dsx*) es activo en machos y hembras, pero su transcrito primario es procesado en un modo específico de sexo (Baker y col. 1987). Este procesamiento alternativo del RNA es el resultado de la acción de los productos de los genes *tra* y *tra2* sobre el gen *dsx* (véase fig. 5-30). Si las proteínas Tra2 y Tra específicas de hembra están presentes, el transcrito *dsx* es procesado en un modo específico de hembra (Ryner y Baker 1991). El patrón de empalme de hembra produce una proteína específica de hembra que activa a genes específicos de hembra (como aquellos de las proteínas del vitelo) e inhibe el desarrollo de macho. Si se produce un Tra no funcional, se genera un transcrito de *dsx* específico de macho. El transcrito de macho codifica una proteína que inhibe las características de hembra y estimula las características de macho.

En las moscas XX, la proteína Doublesex de hembra (Dsx^F) actúa mediante la combinación con el producto del gen *intersex* para producir un factor de transcripción que es responsable de las características específicas de hembra. Este complejo Doublesex potencia el crecimiento del disco genital para producir órganos sexuales de

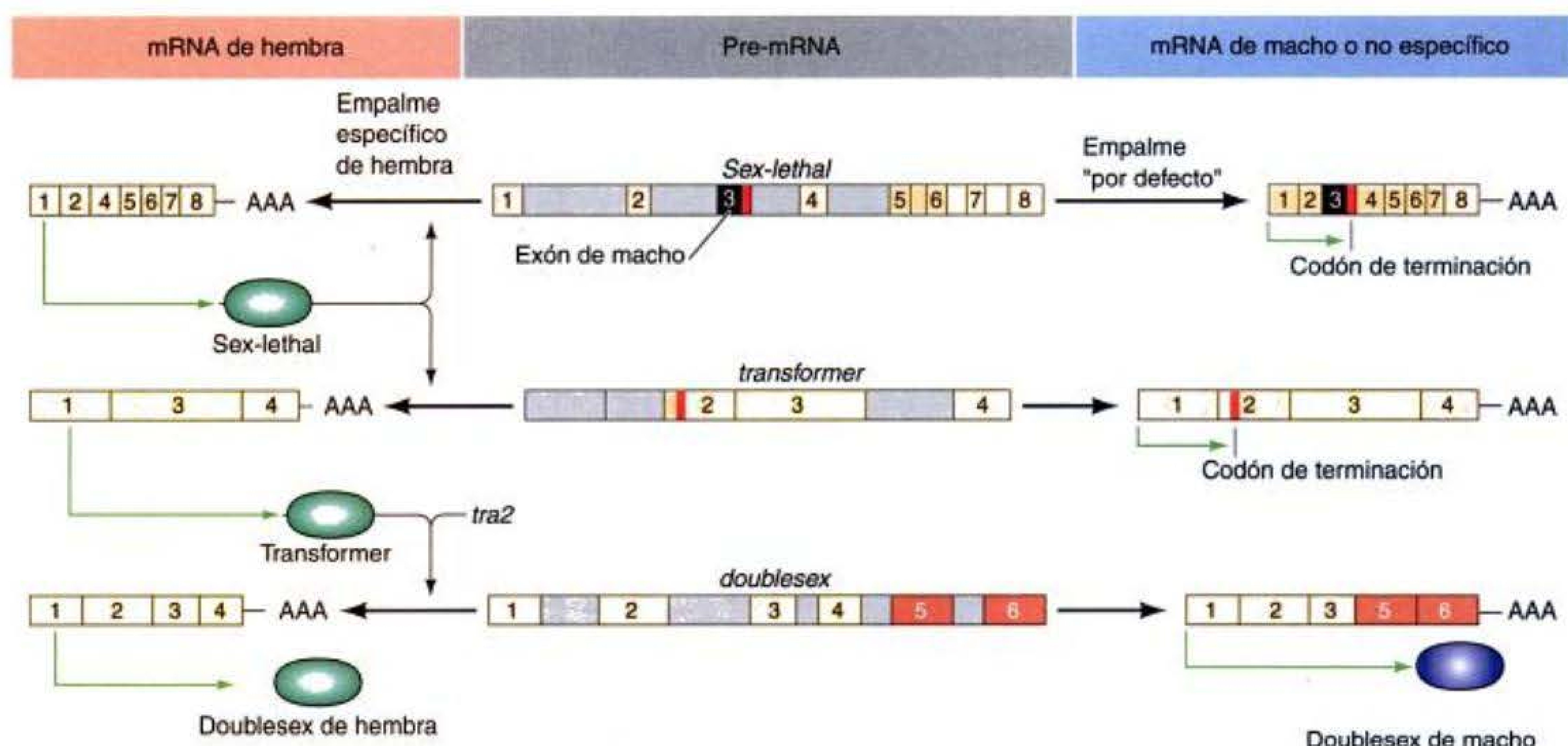


Fig. 17-19. El patrón de empalme de RNA específico de sexo en tres genes principales determinantes del sexo de *Drosophila*. Los pre-mRNA están localizados en el centro del esquema y son idénticos en los núcleos de machos y hembras. En cada caso, el transcrito específico de la hembra se muestra a la izquierda, mientras que el transcrito por defecto (sea macho o no específico) se muestra a la derecha. Los exones están numerados y están señaladas las posiciones de los codones de terminación y de los sitios de poli(A). (Según Baker 1989.)

hembra, reprime los genes FGF responsables de la generación de órganos masculinos accesorios, activa los genes responsables de generar proteínas vitelinas, estimula el crecimiento del conducto de almacenamiento de espermatozoides y modifica la expresión del gen *bric-a-brac* (*bab*) para originar el perfil de pigmentación específica de hembra. En cambio, la proteína Doublesex de macho (Dsx^M) actúa directamente como un factor de transcripción y dirige la expresión de las características específicas de macho. Esto hace que la región del macho del disco genital crezca a expensas de las regiones del disco de la hembra, éste activa a los genes FGF para producir la paragonia (una porción del genital masculino), convierte ciertas estructuras cuticulares en claspers y modifica al gen *bric-a-brac* para producir el patrón de pigmentación del macho (fig. 17-21; Christiansen y col. 2002)

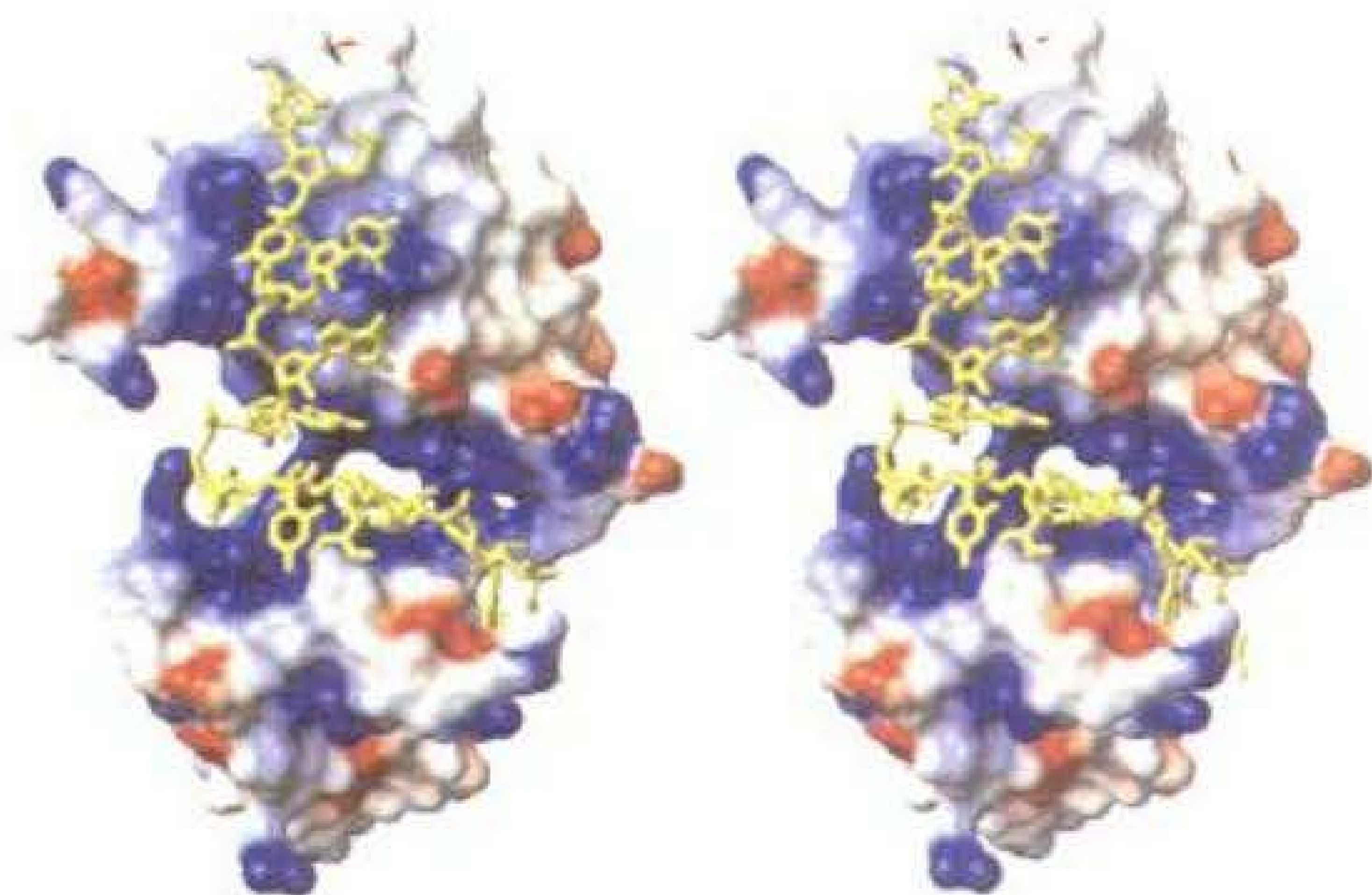


Fig. 17-20. Estereograma que muestra la unión del pre-mRNA de *tra* por la hendidura de la proteína Sxl. La unión de 12 nucleótidos de RNA (GUUGUUUUUUUU) se muestra en amarillo. Las regiones fuertemente positivas se muestran en azul, mientras que las regiones negativas dispersas están en rojo. Vale la pena tratar de cruzar los ojos para conseguir el efecto tridimensional. (De Handa y col. 1999; estereograma cortesía de S. Yokohama.)

Las funciones de las proteínas Doublesex pueden verse en la formación de los genitales de *Drosophila*. Los genitales del macho y de la hembra en *Drosophila* son derivados de poblaciones celulares separadas del **disco genital** de la larva. Dsx^M inhibe a *wingless*, mientras que Dsx^F inhibe al gen *Decapentaplegic* (*Dpp*); estas interacciones determinan el crecimiento de diferentes regiones del disco genital (Keisman y Baker 2001; Keisman y col. 2001; fig. 17-22). En las moscas XY, el primordio del *macho* (derivado del noveno segmento abdominal) crece y se diferencia hacia testículos, mientras que el primordio de la hembra (derivado del octavo segmento abdominal) es atrofiado y se convierte en una placa (tergita) sobre el dorso del octavo segmento abdominal. Esto es debido a la inhibición de *wingless* en el octavo ("hembra") segmento abdominal. En las moscas XX, el primordio de la *hembra* del disco genital crece y se diferencia hacia ovarios, mientras que la porción de macho de ese disco se convierte en paraovario, los órganos accesorios de la hembra. Esto es debido a la inhibición de *dpp* en el noveno ("macho") segmento abdominal. Si el gen *dsx* está ausente (y por lo tanto no se produce ningún transcrito), se desarrollan los primordios del macho y de la hembra, y se producen genitales intersexuales.

De acuerdo con este modelo, el resultado de la cascada de determinación sexual es cuestión del tipo de mRNA

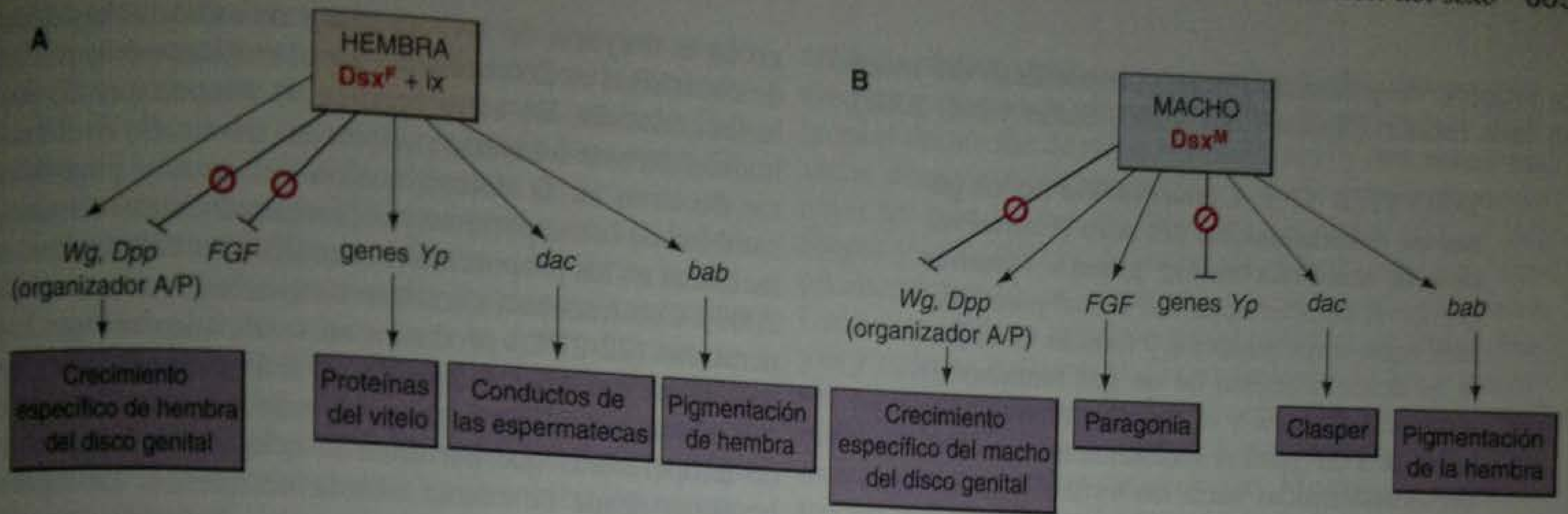


Fig. 17-21. Los papeles de las proteínas Dsx^M y Dsx^F en el desarrollo sexual de *Drosophila*. **A.** Las funciones de Dsx^F con Intersex promueven la expresión específica de hembra de aquellos genes que controlan el crecimiento del disco genital, la síntesis de proteínas vitelinas, la formación de conductos de las espermatecas (que mantienen a los epermatozoides almacenados después del apareamiento) y el patrón de pigmento. **B.** En cambio, Dsx^M actúa como un factor de transcripción que promueve el crecimiento específico de macho del disco genital, la formación de genitales de macho, la conversión de las cutículas en claspers y el patrón de pigmentación específico de macho. Además, Dsx^F reprime a ciertos genes involucrados en las características específicas del macho (tal como la paragonia) y Dsx^M reprime a ciertos genes involucrados en la síntesis de proteínas específicas de la hembra tales como las proteínas del vitelo. (Según Christiansen y col. 2002.)

que es procesado desde el transcrito de *dsx*. Si la proporción X:A es 1, entonces *Sxl* produce un factor de empalme específico de hembra que hace que el transcrito del gen *tra* sea empalmado de un modo específico de hembra. Esta proteína específica de hembra interactúa con el factor de empalme de *tra2* haciendo que el pre-mRNA de *doublesex* sea empalmado de un modo específico de hembra. Si el transcrito *doublesex* no es seguido de este modo, será procesado de un modo "por defecto" para producir el mensajero específico del macho.

La discusión de dimorfismo sexual en *Drosophila* ha sido hasta ahora limitada a aspectos del desarrollo no conductuales. Hay conductas específicas de sexo en el cortejo de *Drosophila* que parecen ser reguladas por los productos del gen *fruitless*. Como con el pre-mRNA de *Doublesex*, las proteínas Tra y Tra2 empalman el pre-mRNA de *fruitless* en un mensajero específico de hembra; el patrón de empalme por defecto es macho. Aunque conductas que no son de hembra parecen ser influenciadas por *fruitless*, la conducta de cortejo del macho pare-

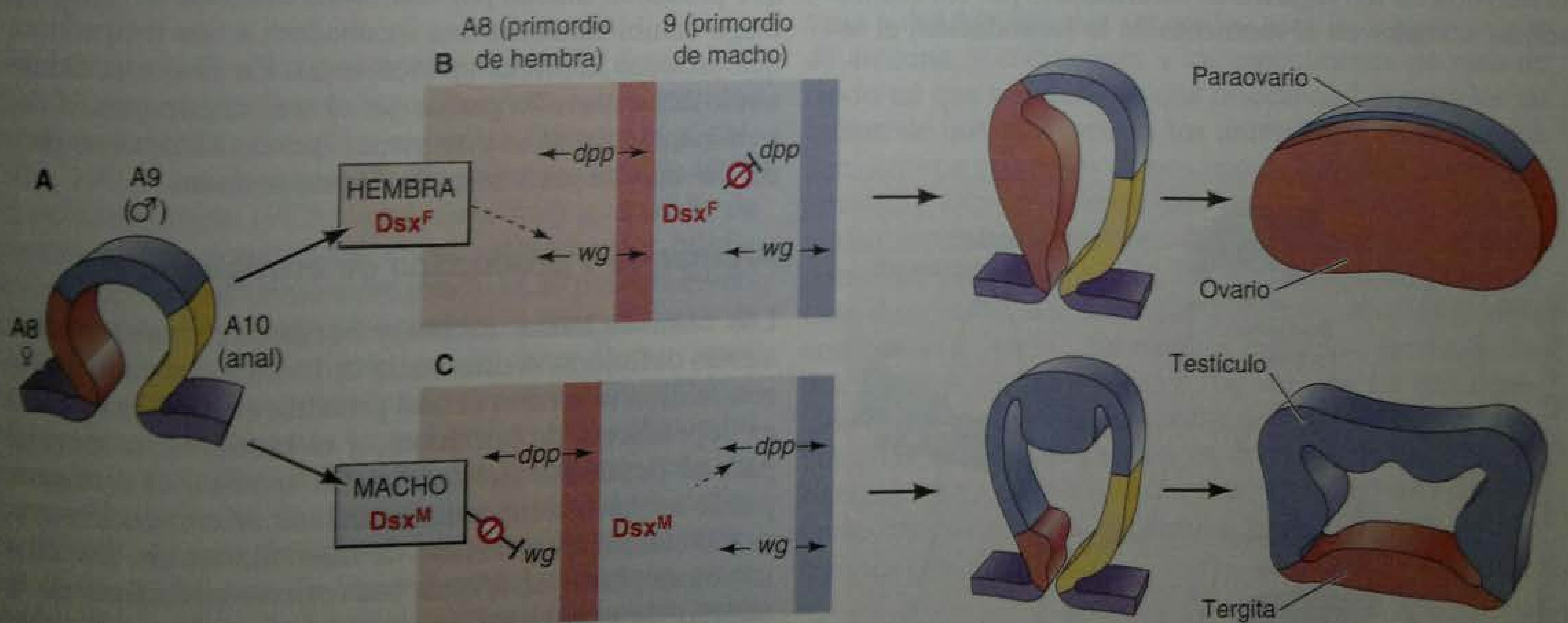


Fig. 17-22. Acción de las proteínas Doublesex para formar las gónadas de *Drosophila*. **A.** El disco genital es derivado de los segmentos abdominales A8, A9 y A10. A8 forma la porción del disco de la hembra. A9 forma la porción del disco del macho y A10 forma las estructuras anales (que no serán discutidas aquí). **B.** La proteína Dsx específica de hembra inhibe a *dpp* en el noveno ("macho") segmento abdominal, mientras que potencia la expresión de *wingless* en el octavo ("hembra") segmento abdominal. Esto causa el crecimiento y el desarrollo del octavo segmento abdominal hacia un ovario y la diferenciación del noveno segmento abdominal hacia el órgano accesorio paraovario. **C.** Por el contrario, la proteína Doublesex específica de macho inhibe la expresión de *wingless* en el octavo segmento abdominal, mientras que potencia la función de *dpp* en el noveno segmento abdominal. Esta interacción permite que el noveno segmento crezca y se desarrolle hacia testículos, mientras que el octavo segmento se diferencia hacia un tergita. (Según Keisman y col. 2001.)

ce requerir de proteínas Fruitless específicas del macho en cada estadio (Ryner y col. 1996; Baker y col. 2001).

SITIO WEB 17.9 **Conservación de los genes de determinación del sexo (Conservation of sex-determining genes).** Mientras que la vía de determinación sexual parece diferir entre seres humanos y moscas de la fruta, el descubrimiento de un gen humano similar a *doublesex* y el descubrimiento de la señal de FGF para el reclutamiento de células mesodérmicas hacia los testículos humanos y de moscas sugiere temas comunes en las dos vías.

SITIO WEB 17.10 **Hermafroditas (Hermaphrodites).** En *C. elegans* y en muchos otros invertebrados, el hermafroditismo es la regla general. Estos animales nacen con ovarios y testículos. En algunos peces, se observa hermafroditismo secuencial, con un pez individual que es hembra en algunas estaciones y macho en otras. Entre los seres humanos, los hermafroditas son poco frecuentes y por lo general estériles.

DETERMINACIÓN DEL SEXO POR EL AMBIENTE

Determinación del sexo dependiente de la temperatura en los reptiles

Mientras que el sexo de la mayoría de las víboras y de la mayoría de los lagartos es determinado por los cromosomas sexuales en el momento de la fecundación, el sexo de la mayoría de las tortugas y de todas las especies de cocodrilos es determinado por el ambiente después de la fecundación. En estos reptiles, la temperatura de los huevos durante un cierto período del desarrollo es el factor decisivo en la determinación del sexo y pequeños cambios en la temperatura pueden causar cambios espectaculares en las proporciones sexuales (Bull 1980; Crews 2003). Con frecuencia, los huevos incubados a bajas temperaturas (22-27ºC) producen un sexo, mientras que los huevos incubados a temperaturas más elevadas (30ºC y por arriba) producen el otro. Hay solo un pequeño rango de temperaturas que permiten la eclosión de machos y hembras desde la misma nidada de huevos. La figura 17-23 muestra los cambios abruptos inducidos por la temperatura en las proporciones de sexo para la tortuga de las orejas rojas, resbaladora o *"red-eared slider"*. Si una nidada de huevos es incubada a una temperatura por debajo de 28ºC, todas las tortugas que eclosionan de los huevos serán macho. Por arriba de 31ºC, cada huevo da origen a una hembra. A temperaturas entre ambos extremos, la nidada dará origen a individuos de ambos sexos. Variaciones sobre este tema también existen. Los huevos de la tortuga mordedora *Macroclemys*, por ejemplo, se convierten en hembra a temperaturas frías (22ºC o inferiores) o cálidas (28ºC o más elevadas). Entre estos dos extremos predominan los machos.

Uno de los reptiles mejor estudiados es la tortuga europea de las charcas, *Emys obicularis*. En los estudios de laboratorio, la incubación de los huevos de *Emys* a temperaturas por arriba de 30ºC produce solo hembras, mientras que a temperaturas por debajo de 25ºC produce una nidada de solo machos. El umbral de temperatura (en el que la proporción de sexo es uniforme) es de 28,5ºC (Pieau y col. 1994). El período del desarrollo durante el cual se produce la determinación del sexo puede ser descubierto mediante la incubación de huevos a temperaturas que producen macho por una cierta cantidad de tiempo y luego cambiándolos a una incubadora a una temperatura que produce hembras (y viceversa). En *Emys*, el último tercio del desarrollo parece ser el más crítico para la determinación del sexo y se piensa que las tortugas no pueden invertir su sexo después de este período.

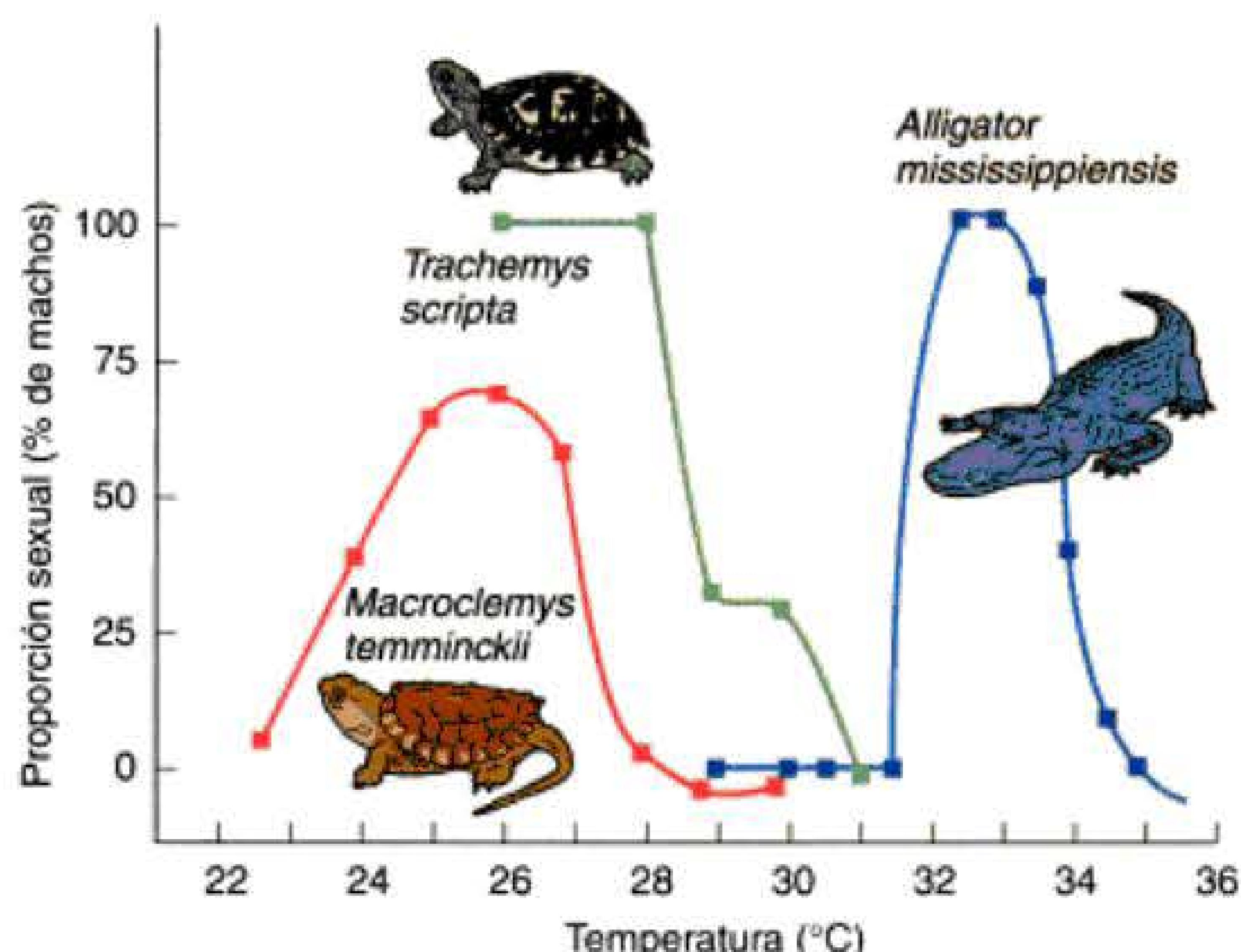


Fig. 17-23. Determinación del sexo dependiente de la temperatura en tres especies de reptiles: el caimán Americano (*Alligator mississippiensis*), la tortuga (*Trachemys scripta elegans*) y la tortuga mordedora aligator (*Macroclemys temminckii*). (Según Crain y Guillette 1998.)

Aromatasa y producción de estrógenos

Los caminos hacia machos y hembras en reptiles están siendo definidos. A diferencia de la situación en mamíferos, la determinación sexual primaria en reptiles (y aves) es dependiente de hormonas, y el estrógeno es esencial para el desarrollo del ovario. En reptiles, el estrógeno puede anular la temperatura e inducir diferenciación ovárica incluso a temperaturas de masculinización. Del mismo modo, la inyección de huevos con inhibidores de la síntesis de estrógenos produce crías machos, aún si los huevos son incubados a temperaturas que con frecuencia producen hembras (Dorizzi y col. 1994; Rhen y Lang 1994). Además, el tiempo de sensibilidad para los efectos de los estrógenos y de sus inhibidores coincide con el momento en el que normalmente se produce la determinación sexual (Bull y col. 1988; Gutzke y Chymiy 1988).

Parece que la enzima **aromatasa**, que convierte la testosterona en estrógeno, es crítica en la determinación sexual dependiente de temperatura. Los inhibidores de las síntesis de estrógenos utilizados en estos experimentos

mencionados antes funcionan mediante el bloqueo de la enzima aromatasa, y demuestran que niveles de aromatasa experimentalmente bajos producen crías machos. Esta correlación parece ser mantenida también bajo condiciones naturales. La actividad de aromatasa de *Emys* es muy baja a una temperatura de 25°C que promueve machos. A una temperatura de 30°C que promueve hembras, la actividad de aromatasa se incrementa de manera espectacular durante el período crítico para la determinación sexual (Desvages y col. 1993; Pieau y col. 1994). La actividad de aromatasa dependiente de temperatura también es observada en galápagos de dorso de diamante (tortuga de diamante o terrapín diamante) y su inhibición masculiniza sus gónadas* (Jeyasuria y col. 1994).

En estas especies, el sexo parece residir verdaderamente en el cerebro. La aromatasa es producida en dos sitios principales en el embrión: las gónadas y el cerebro. Sin embargo, el nivel de aromatasa gonadal parece ser el mismo en ambos sexos. Es la actividad de aromatasa *cerebral* la que se correlaciona con la temperatura y sexo de hembra. Cuando los embriones de *Trachemys* (tortuga de las orejas rojas o resbaladora) o *Lepidochelys* (una tortuga golfina –o tortuga marina Ridley verde oliva) fueron incubados a temperaturas más elevadas (para producir hembras), sus cerebros tenían significativamente una actividad de aromatasa más elevada que la de los cerebros de sus compañeros de nidada incubados a temperaturas más bajas, productoras de machos (Salame-Mendez y col. 1998; Willingham y col. 2000). Este incremento en la producción de estrógeno cerebral puede inducir cambios neuroendocrinos que resultan en la formación de esteroides gonadales y en la determinación del ovario. Los mecanismos por los cuales esto se produce se mantienen en su mayor parte sin explorar.

Inversión sexual, aromatasa y conservación biológica

Las ventajas y desventajas evolutivas de la determinación del sexo dependiente de temperatura son discutidas en el capítulo 22. Estudios recientes (Bergeron y col. 1994, 1999) han demostrado que componentes de bifenil policlorinatado (PCB), una clase muy extendida de contaminantes introducidos en el ambiente por humanos, pueden actuar como estrógenos. PCB pueden invertir el sexo de las tortugas originadas a temperaturas de "macho." Este conocimiento puede tener importantes consecuencias en los esfuerzos de conservación ambiental para proteger especies en peligro de extinción como tortugas y anfibios, en las que las hormonas pueden efectuar cambios en la determinación sexual primaria. En efecto, algunos biólogos conservacionistas de reptiles defienden el uso de tratamientos hormonales para elevar el porcentaje de hembras en las especies en peligro de extinción (www.reptileconservation.org).

Además de las muertes debidas a la disminución del ozono y a infecciones de hongos (véase capítulo 3), los anfibios pueden estar en riesgo de los herbicidas que promueven o destruyen estrógenos. Uno de estos casos involucra el desarrollo de ranas hermafroditas y desmasculinizadas después de la exposición a dosis extremadamente bajas del popular asesino de malezas atrazina (fig. 17-24; Hayes y col. 2002a). Atrazina es el herbicida más ampliamente usado en el mundo; tan solo en los Estados Unidos se utilizan anualmente 60 millones de libras. Hayes y colegas hallaron que la exposición de los renacuajos a concentraciones tan bajas como 0,1 partes por mil millones producían alteraciones gonadales y otras anomalías sexuales en las ranas macho. Muchas de las ranas macho que se desarrollaban a dosis de 0,1 partes por mil millones y más elevadas tenían ovarios además de testículos. A concentraciones de 1 parte por mil millones de atrazina, los sacos vocales de las ranas macho (que el macho debe tener con la finalidad de dar la señal para potenciales apareamientos) no pueden desarrollarse apropiadamente.

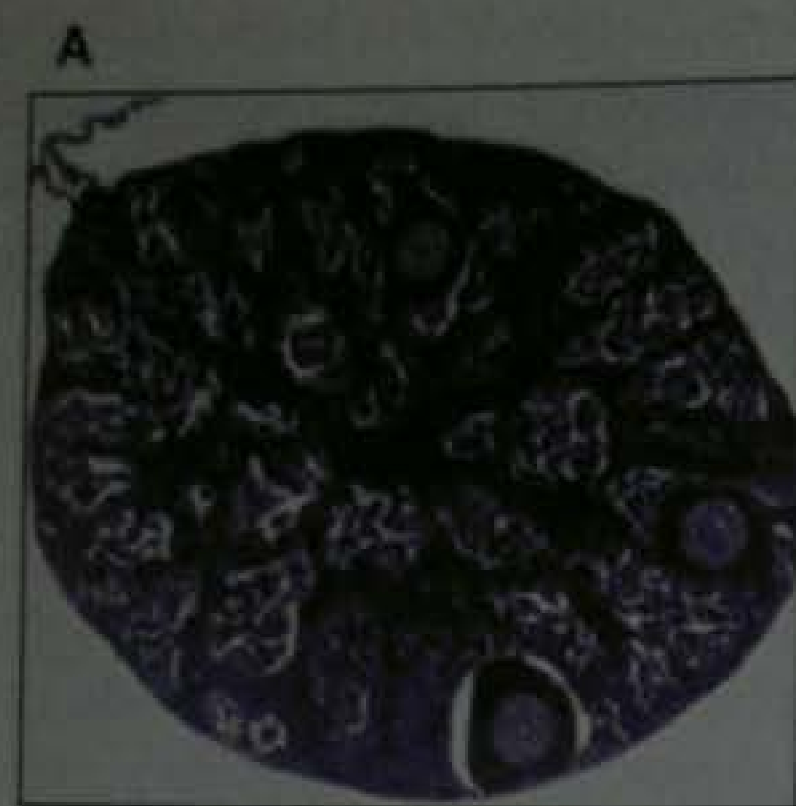
Se piensa que atrazina induce a la aromatasa, la enzima capaz de convertir testosterona en estrógeno (Kniewald y col. 1995; Crain y col. 1997). Los niveles de testosterona de las ranas macho adultas fueron reducidos casi un 90% (para controlar los niveles de hembra) mediante la exposición de las ranas a 25 partes por billón de atrazina por 46 días. Éstas son dosis ecológicamente muy relevantes. La cantidad deducible de atrazina en nuestra agua bebible es de 3 partes por billón y los niveles de atrazina pueden ser tan elevados como de 224 partes por billón en los arroyos en el medio oeste de los Estado Unidos (Battaglin y col. 2000; Barbash y col. 2001).

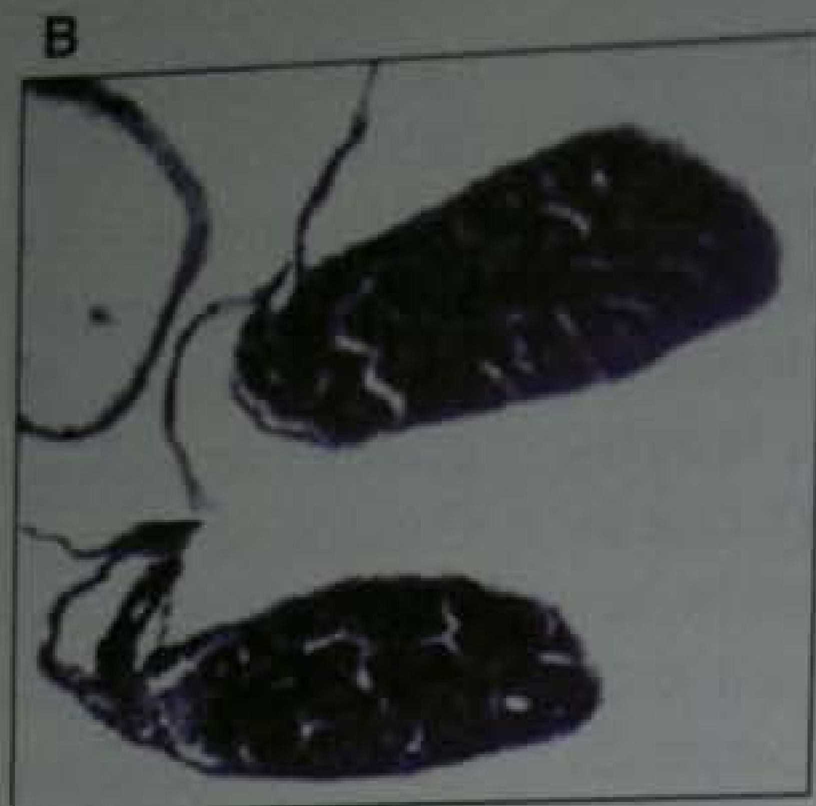
Debido a la cantidad de atrazina en el agua y a la sensibilidad de las ranas a este componente, este herbicida puede ser devastador para las poblaciones salvajes. Hayes y sus colegas recogieron ranas leopardo y agua de ocho sitios a lo largo del centro de Estados Unidos (Hayes y col. 2002b, 2003). Ellos enviaron las muestras de agua a dos laboratorios separados para la determinación de atrazina, y codificaron a los especímenes de rana de modo tal que los técnicos que disecaban las gónadas no sabían de qué sitio venían los animales. Los resultados demostraron que todos menos uno de los sitios contenían atrazina y éste fue el único sitio desde el cual las ranas no tenían anomalías gonadales. A concentraciones tan bajas como 0,1 partes por billón, las ranas leopardo presentaban disgenesia testicular (crecimiento atrofiado) o la conversión a ovarios. En muchos ejemplos, fueron hallados ovocitos en los testículos (fig. 17-24). La preocupación sobre la aparente capacidad de atrazina para perturbar a las hormonas sexuales en la vida salvaje y en los humanos ha resultado en la prohibición del uso de este herbicida por Francia, Alemania, Italia, Noruega, Suecia y Suiza (Dalton 2002).

Determinación del sexo dependiente de la localización en Bonellia *y* Crepidula

Como se mencionó en el capítulo 3, el sexo del gusano equiurido *Bonellia viridis* depende de dónde se deposita la larva. Si una larva de *Bonellia* se deposita sobre el suelo del océano, ésta se desarrolla hacia una hembra de

* Un sorprendente hallazgo es que la inyección de un inhibidor de aromatasa en los huevos de especies de lagartos partenogenéticos completamente femeninos causa la formación de machos (Wibbels y Crews 1994).





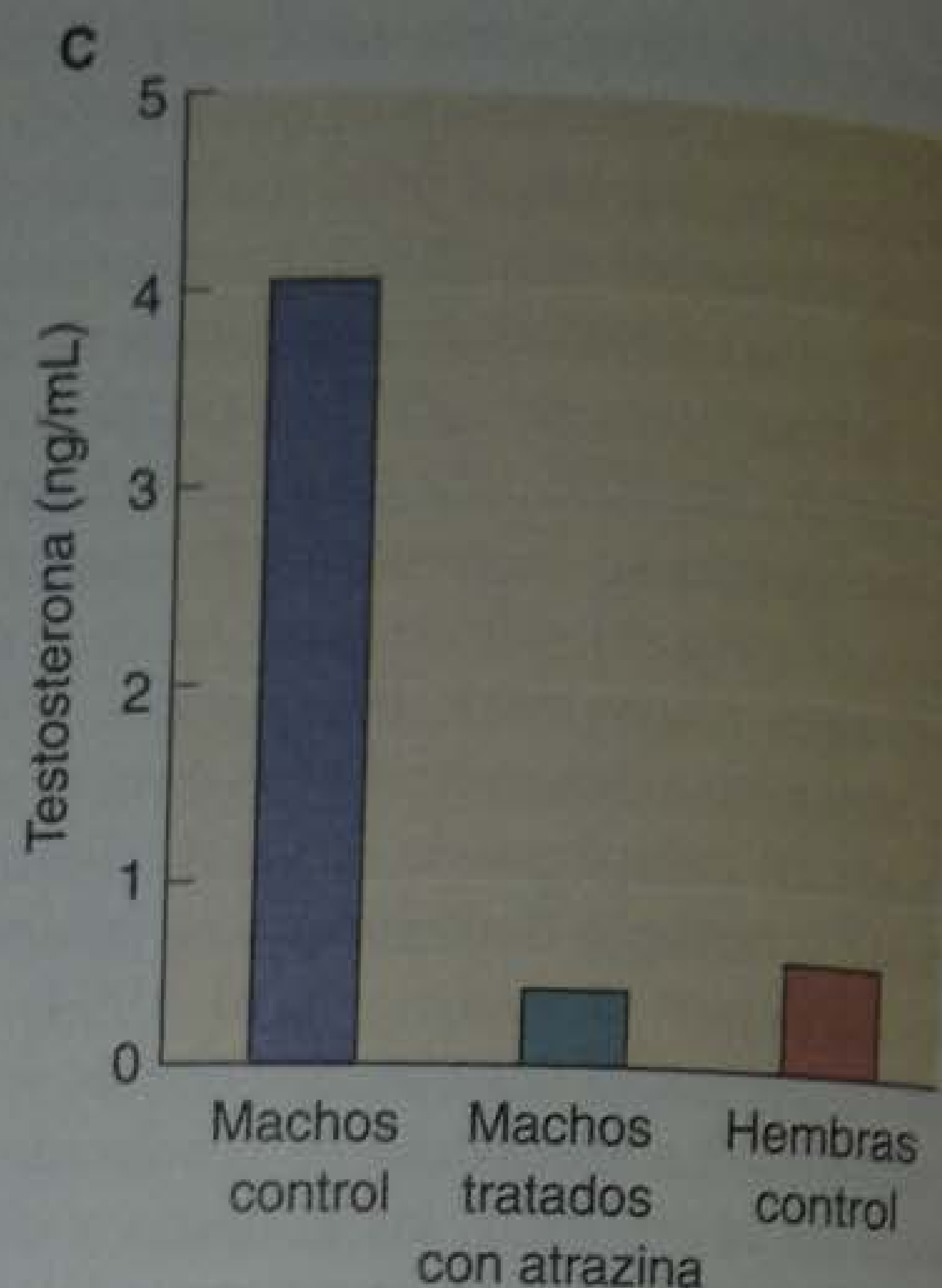


Fig. 17-24. Desmasculinización de las ranas por bajas cantidades de atrazina. **A.** Testículo de una rana desde un sitio natural que tiene 0,5 partes por billón (ppb) de atrazina. Los testículos contienen tres lóbulos que están desarrollando espermatozoides y un ovocito. **B.** Dos testículos de rana desde un sitio natural que contienen 0,8 ppb de atrazina. Estos órganos muestran severa disgenesia testicular que caracterizó al 28% de las ranas del lugar. **C.** Efecto de una exposición de 46 días a 25 ppb de atrazina sobre los niveles de testosterona plasmática en un *Xenopus* macho sexualmente maduro. Los niveles en los machos control fueron unas diez veces más elevados que en las hembras control; los machos tratados con atrazina tenían niveles de testosterona plasmática como los de las hembras control o por debajo. (A, B, según Hayes y col. 2003, microfotografías cortesía de T. Hayes; C, según Hayes y col. 2002a.)

10 cm de longitud. Si la larva es atraída por la probóscide de la hembra, ésta viaja a lo largo del tubo hasta que ingresa en el cuerpo de la hembra. Allí se diferencia a un macho diminuto (1-3 mm de longitud) que es esencialmente un parásito de la hembra productor de espermatozoides (véase fig. 3-1).

Otras especies en las que es afectada la determinación sexual por la localización del organismo es el caracol seba *Crepidula fornicata*. En estas especies, los individuos se apilan uno sobre otro para formar un montículo. Los individuos jóvenes son siempre machos. Esta fase es seguida por la degeneración del sistema reproductor del macho y por un período de labilidad. La siguiente fase puede ser macho o hembra, dependiendo de la posición del animal en el montículo. Si el caracol está agarrado a una hembra, se convertirá en macho. Si este caracol es retirado de su adherencia, llegará a ser hembra. Del mismo modo, la presencia de grandes números de machos provocará que algunos de los machos se conviertan en hembras. Sin embargo, una vez que un individuo se convierte en hembra, no volverá a ser macho (Coe 1936). Más ejemplos sobre la determinación sexual dependiente del contexto serán estudiados en el capítulo 22.

La naturaleza ha proporcionado muchas variaciones sobre su obra maestra. En algunas especies, incluidos la mayoría de los mamíferos e insectos, el sexo es determinado por cromosomas; en otras especies, el sexo es asunto de las condiciones ambientales. Finalmente se están comenzando a entender los mecanismos por los cuales es creada esta obra maestra.

Resumen: determinación del sexo

1. En los mamíferos, la determinación sexual primaria (la determinación del sexo de la gónada) es una función de los cromosomas sexuales. Los individuos XX son hembras, los individuos XY son machos.
2. El cromosoma Y desempeña un papel clave en la determinación sexual masculina. Los mamíferos XY y XX tienen una gónada bipotencial que produce los cordones sexuales primarios. En los animales XY, estos cordones continúan siendo formados dentro de la gónada y finalmente se diferencian a células de Sertoli de los testículos. El mesénquima intersticial se convierte en las células de Leydig.
3. En los individuos XX, los cordones sexuales internos degeneran y surge un segundo grupo de cordones sexuales corticales. Éstos se mantienen sobre la periferia de la gónada. Las células germinales ingresan en los cordones sexuales, pero no serán liberadas de la gónada hasta la pubertad. El epitelio de los cordones sexuales se convierte en las células de la granulosa; el mesénquima se convierte en las células tecales.
4. En los seres humanos, el gen *SRY* es el factor determinante testicular del cromosoma Y. Éste sintetiza una proteína de unión al ácido nucleico que puede funcionar tanto como un factor de transcripción o como un factor de empalme del RNA. Se piensa que activa a SOX9.
5. El gen *SOX9* también puede iniciar la formación de los testículos. También puede funcionar como un factor de transcripción y como un factor de empalme. Se une al gen que codifica el factor inhibidor de Müller (FIM) y también puede ser responsable de la activación de *Fgf9*.
6. Wnt4 y Dax1 están involucrados en la formación del ovario. Parte de su función parece ser la inhibición

de la vía de formación del testículo. Los genes que generan tejido ovárico no están tan bien caracterizados como los que inducen la formación del testículo.

7. La determinación sexual secundaria en los mamíferos involucra a las hormonas producidas por las gónadas en desarrollo. En las hembras, el conducto de Müller se diferencia hacia trompas de Falopio (oviductos), útero, cuello uterino y porción superior de la vagina. En los mamíferos machos, los conductos de Müller son destruidos por el FIM producido por las células de Sertoli, mientras que la testosterona producida por las células de Leydig lleva al conducto de Wolff a diferenciarse hacia conducto deferente y la vesícula seminal. En las hembras de mamíferos, el conducto de Wolff degenera debido a la falta de testosterona, mientras que los estrógenos permiten la diferenciación del conducto de Müller.
8. La conversión de testosterona a dihidrotestosterona en los precursores del rudimento genital y de la glándula prostática permite la diferenciación del pene, del escroto y de la glándula prostática.
9. En los individuos con mutaciones de estas hormonas o de sus receptores se puede hacer una distinción entre sus características sexuales primarias y secundarias.
10. En *Drosophila*, el sexo es determinado por la proporción de cromosomas X en relación con los autosomas y el cromosoma X no cumple ningún papel en la determinación del sexo. No hay hormonas sexuales, de modo que cada célula toma una decisión de determinación sexual.
11. El gen *Sex-lethal* de *Drosophila* es activado en las hembras (por proteínas codificadas sobre el cromosoma X) y es reprimido en los machos (por factores codificados sobre los autosomas). La proteína Sxl actúa como un factor de empalme del RNA para empalmar un exón inhibitorio del transcrito de *transformer*. Por esta razón, las moscas hembra tienen una proteína Tra activa, mientras que los machos no la tienen.
12. La proteína Tra también actúa como un factor de empalme del RNA para empalmar exones del transcrito de *doublesex*. El gen *dsx* es transcrito en las células XX y XY, pero su pre-mRNA es procesado para formar diferentes mRNA, según si la proteína Tra está presente. Las proteínas traducidas desde ambos mensajeros de *dsx* son activas, y activan o inhiben la transcripción de un grupo de genes involucrados en la producción de características sexualmente dimórficas de la mosca.
13. En tortugas y caimanes, el sexo es determinado con frecuencia por la temperatura durante el tiempo de determinación de la gónada. Debido a que el estrógeno es necesario para el desarrollo del ovario, es posible que diferentes niveles de aromatasa (la enzima que puede convertir la testosterona en estrógeno) distingan los patrones de diferenciación gonadal del macho de los de la hembra.
14. La aromatasa puede ser activada por componentes ambientales que causan la desmasculinización de las gónadas del macho en los animales en los cuales la determinación sexual primaria puede ser efectuada por hormonas.
15. En algunas especies como *Bonellia* o *Crepidula*, el sexo es determinado por la posición del individuo con respecto a otros individuos de la misma especie.

Bibliografía citada

Achermann, J. C., M. Ito, P. Hindmarsh and J. Jameson. 1999. A mueation in the gene encoding steroidogenic factor-I causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. Nature Genet. 22: 125-126.

Adams, I. R. and A. McLaren. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: Switching from oogenesis to spermatogenesis. Development 129: 1155-1164.

Andersson, S., D. M. Berman, E. P. Jenkins and D. W. Russell. 1991. Deletion of steroid 5a-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature 354: 159-161.

Arango, N. A., R. Lovell-Badge and R. E. Behringer. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: In vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. Cell 99: 409-419.

Aristotle. ca. 335 B.C.E. The generation of animals. Translated by A. Platt. In J. Barnes (ed.), The Complete Works of Aristotle, Vol. 8. Princeton University Press, Princeton, NJ. 1984.

Baker, B. S. 1989. Sex in flies: The splice of life. Nare 340: 521-524.

Baker, B. S. and K. A. Ridge. 1980. Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in Drosophila melanogaster. Genetics 94: 383-423.

Baker, B. S., R. N. Nagoshi and K. C. Burtis. 1987. Molecular genetic aspects of sex determination in Drosophila. BioEssays 6: 66-70.

Baker, B. S., B. J. Taylor and J. C. Hall. 2001. Are complex behaviors specified by directed regulatory genes? Reasoning from fruit flies. Cell 105: 13-24.

Barbash, J. E., G. P. Thelin, D. W. Kolpin and R. J. Gilliom. 2001 Major herbicides in ground water: Results from the National Water-Quality Assessment.J. Environ. Qual. 30: 831-845.

Bardoni, B. and 11 others. 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. Nature Genet. 7: 497-501.

Barraclough, C. A. and R. A. Gorski. 1962. Studies on mating behavior in the androgensterilized female rat in relation to the hypothalamic regulation of sexual behavior. J. Endocrinol. 25: 175-182.

Battaglin, W. A., E. T. Furlong, M. R. Burkhardt and C. J. Peter. 2000 Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs, and ground water in the midwestern United States 1998. Sci. Total Environ. 248:123-133.

Bell, L. R., E. M. Maine, P. Schedl and T. W. Cline. 1988. Sex-lethal, a Drosophila sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA-binding proteins. Cell 55: 1037-1046.

Bell, L. R., J. I. Horabin, P. Schedl, and T. W. Cline. 1991. Positive autoregulation

of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in Drosophila. Cell 65: 229-239.

Belote, J. M., M. B. McKeown, D. J. Andrew T. N. Scott, M. F. Wolfner and B. S. Baker. 1985a. Control of sexual differentiation in Drosophila melanogaster. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 50: 605-614.

Bergeron, J. M., D. Crews and J. A. MacLachlan. 1994. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. Environ. Health Perspect. 102: 780-781.

Bergeron, J. M., E. Willingham, C. T. Osborn III, T. Rhen and D. Crews. 1999. Developmental synergism of steroidal estrogens in sex determination. Environ. Health Perspect. 107: 93-97.

Berkovit, G. D. and 7 others. 1992. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphrodites. Hum. Genet. 88: 411-416.

Bernstein, R., T. Jenkins, B. Dawson, J. Wagner, G. Devald, G. C. Koo and S. S. Wachtel. 1980. Female phenot,vpe and multiple abnormalities in sibs with a Y chromosome and partial X-chromosome duplication: H-Y antigen and Xg blood group findings. J. Med. Genet. 17: 291-300.

Beukeboom, L. W. 1995. Sex determination in Hymenoptera: A need for genetic and molecular studies. Bioessays 17: 813-817.

Birk, O. S. and 11 others. 2000. The LIM homeobox gene LHX9 is essential for mouse gonad formation. Nature 403: 909-913.

Bleier, R. 1984. Science and Gender. Pergamon, New York.

Boggs, R. T., P. Gregor, S. Idriss, J. M. Belote and M. McKeown. 1987. Regulation of sexual differentiation in D. melanogaster via alternative splicing of RNA from the transformer gene. Cell 50: 39-747.

Breedlove, S. M. 1992. Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. J. Neurosci. 12: 4133-4142.

Breedlove, S. M. 1997. Sex on the brain. Nature 389: 801.

Bridges, C. B. 1921. Triploid intersexes in Drosophila melanogaster. Science 54: 252-254.

Bridges, C. B. 1925. Sex in relation to chromosomes and genes. Am. Nat. 59: 127-137.

Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. 55: 3-21.

Bull, J. J., W. H. N. Gutzke and D. Crews. 1988. Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. Gen. Comp. Endocrinol. 70: 425-428.

Burgoyne, P. S., M. Buehr and A. McLaren.1988. XY follicle celis in ovaries of XX-XY female mouse chimaeras. Development 104: 683-688.

Capel, B., K. H. Aibrecht, L. L. Washburn and E. M. Eicher. 1999. Migration of mesonephric cells into the mammaiian gonad depends on Sry. Mech. Dev. 84: 127-131.

Carroll, J. and P. R. Wolpe. 1996. Sexuality and Gender in Society. HarperCollins, New York.

Cate, R. L. and 18 others. 1986. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the gene in animal cells. Cell 45: 685-698.

Christiansen, A. E., E. L. Keisman, S. M. Ahmad and B. S. Baker. 2002. Sex comes in from the cold: The integration of sex and pattern. Trends Genet. 18: 510-516.

Cline, T. W. 1983. The interaction between daughterless and Sex-lethal in triploids: A novel sex-transforminmaternal effect linking sex determination and dosage compensation in Drosophila melanogasta. Dev. Biol. 95: 260-274.

Cline, T. W. 1988. Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of severai discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in Drosophila that switch Sxl between two alternative stable expression states. Genetics 119: 829-862.

Cline, T. W. 1993. The Drosophila sex determination signal: How do flies count to two? Trends Genet. 9: 385-390.

Coe, W. R. 1936. Sexual phases in Crepidula. J. Exp. Zool. 72: 455-477.

Colvin, J., R. P. Green, J. Schmal, B. Capel and D. M. Ornitz. 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. Cell 104: 875-889.

Couse, J. F. and K. S. Korach. 2001. Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor nuLi mice. Ann. N.Y Acad. Sci. 948: 1-8.

Couse, J. F., S. C. Hewitt, D. O. Bunch, M. Sar, V. R. WaLker, B. J. Davis and K. S. Korach. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. Science 286: 2328-2331.

Crain, D. A. and L. J. Guillette Jr. 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. Anim. Reprod. Sci. 53: 77-86.

Crain, D. A., L. J..Guillette, Jr., A. A. Rooney and D. B. Pickford. 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (Alligator mississippiensis) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. Environ. Health Perspect. 105: 528-533.

Crews, D. 2003. Sex determination: where environment and genetics meet. Evol. Dev. 5: 50-55.

Dalton, R.2002. Frogs put in the gender blender by America's favorite herbicide. Nature 416: 665-666.

De Jonge, F. H., J.-W. Muntjewerff, A. L. Louwerse and N. E. Van de Poll.1988. Sexual behavior and sexual orientation of the female rat after hormonal treatment during various stages of development. Horm. Behav. 22: 100-115.

De Santa Barbara, P., B. Moniot, F. Poulat and P. Berta.2000. Expression and subcellular localization of SF-I, SOX9, WTI, and AMH proteins during early human testicular development. Dev. Dynam. 217: 293-298.

Desvages, G., M. Girondot and C. Pieau. 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle Dermochelys coriacea. Gen. Comp. Endocrinol. 92: 54-61.

Dorizzi, M., G. Richard-Mercier, G. Desvages and C. Pieau. 1994. Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. Dierentiation 58: 1-8.

Eicher, E. M. and L. L. Washburn. 1983. Inherited ex reversal in mice: Identification of a new sex-determining gene. J. Exp. Zool. 228: 297-304.

Eicher, E. M. and L. L. Washburn. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. Annu. Rev. Genet. 20: 327-360.

Eicher, E. M. and 8 others. 1996. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-Y-POS sex reversal. Nature Genet. 14: 206-209.

homosexual men. Science 253: 1034-1037.

Ma, L., G. V. Benson, H. Lim, S. K. Dey and R. L. Maas. 1998. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: Regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in Mullerian duct by synthetic estrogen diethylstilbesterol (DES). Dev. Biol. 197: 141-154.

Mansour, S., C. M. Hall, M. E. Pembrey and I. D. Young. 1995. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. J. Med. Genet. 32: 415-420.

Margarit, E., M. D. Coll, R. Olivo, D. Gómez, A. Soler and F. Ballesta. 2000. SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite. Am. J. Med. Genet. 90: 25-28.

Marshall, E. 1995. NIH's "gay gene" study questioned. Science 268: 1841.

Marx, J. 1995. Mammalian sex determination: Snaring the genes that divide sexes for mammals. Science 269: 1824-1825.

McClung, C. E. 1902. The accessory chromosome sex determinant? Biol. Bull. 3: 72-77.

McEwen, B. S., I. Leiberburg, C. Chaptal and L. C. Krey. 1977. Aromatization: Important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. Horm. Behav. 9: 249-263.

McLaren, A. 1991 Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. Bioessays 13: 151-156.

McLaren, A. and D. Southee. 1997. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. Dev. Biol. 187: 107-113.

Merke, D. P., S. R. Bornstein, N. A. Avila and G. P. Chrousos.2002. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Ann. Intern. Med. 136: 320-334.

Meyer, W. J., B. R. Migeon and C. J. Migeon. 1975. Locus on human X chromosome for dihydrotestosterone receptor and androgen insensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1469-1472.

Migeon, C. J. and A. B. Wisniewski. 2000. Human sex differentiation: From transcription factors to gender. Horm. Res. 53: 111-119.

Moore, C. L.1990. Comparative development of vertebrate sexual behavior: Levels, cascades, and webs. In D. A. Dewsbury (ed.), Contemporary Issues in Comparative Psychology. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 278-299.

Moore, C. L., H. Dou and J. M. Juraska. 1992. Maternal stimulation affects the number of motor neurons in a sexually dimorphic nucleus of the lumbar spinal cord. Brain Res. 572: 52-56.

Morgan, T. H. and C. B. Bridges. 1919. The origin of gvnandromorphs. In Contributions to the Study of Drosophila. Publication no. 278. Carnegie Institution of Washington, Washington, DC, pp. 1-122.

Muscatelli, F. and 14 others. 1994. Mutations in the DAX-I gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. Nature 372: 672-634.

Nachtigal, M. W., Y. Hirokawa, D. L. Enyeart-van Houten, J. N. Flanagan, G. D. Hammer and H. A. Ingraham. 1998. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-I in sex-specific gene expression. Cell 93: 445-454.

Nagoshi, R. N., M. McKeown, K. C. Burtis, J. M. Belote and B. S. Baker. 1988. The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in D. melanogaster. Cell 53: 229-236.

Ohe, K. E. Lalli, and P. Sassone-Corsi. 2002. A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 1146-1151.

Pask, A. and J. A. Graves. 1999 Sex chromosomes and sex-determining genes: Insights from marsupials and monotremes. Cell. Mol. Life Sci. 55: 864-875.

Phoenix, C. H., R. W. Goy, A. A. Gerall and W. C. Young. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone proprionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology 65: 369-382.

Pieau, C., N. Girondot, G. Richard-Mercier, M. Desvages, P. Dorizzi and P. Zaborski. 1994. Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle. J. Exp. Zool. 270: 86-93.

Pontiggia, A., R. Rimini, P. N. Goodfellow, R. Lovell-Badge and M. E. Bianchi. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of Sry/DNA complexes. EMBO J. 13: 6115-6124.

Poulat, F. and 7 others. 1995. Nuclear localization of the testis-determining gene product SRY. J. Cell. Biol. 128: 737-748.

Reddy, V. R., F. Naftolin and K. J. Ryan. 1974. Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues from fetal and neonatal rats. Endocrinology 94: 117-121.

Rhen, T. and J. W. Lang. 1994. Temperature-dependent sex deterrnination in the snapping turtle: Manipulation of the embryonic sex steroid environment. Gen. Comp. Endocrinol. 96: 243-254.

Rice, G., C. Anderson, N. Risch and G. Ebers. 1999. Male homosexuality: Absence of linkage to microsatellite markers at Xq28. Science 284: 665-667.

Risch, N., E. Squires-Wheeler and B. J. B. Keats. 1993. Male sexual orientation and genetic evidence. Science 262: 2063-2065.

Roberts, L. M., Y. Hirokawa, M. W. Nachtigal and H. A. Ingraham. 1999. Paracrine-ediated apoptosis in reproductive tract development. Development 208: 110-122.

Ryner, L. C. and B. S. Baker. 1991. Regulation ot doublesex pre-mRNA processing occurs by 3' splice site activation. Genes Dev. 5: 2071-2085.

Ryner, L. C. and 8 others. 1996. Control of male sexual behavior and sexual orientation in Drosophila by the fruitless gene. Cell 87: 1079-1089.

Salame-Mendez, A. J. Herrera-Munoz, N. Morena-Mendoza and H. Merchant-Larios. 1998. Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle epidochelys olivacea. J. Exp. Zool. 280: 304-313.

Salz, H. K., T. W. Cline and P. Schedl. 1987. Functional changes associated with structural alterations induced by mobilization of a P element inserted into the Sex-lethal gene of Drosophila. Genetics 117: 221-231.

Salz, H. K., E. M. Maine, L. N. Keyes, M. E. Samuels, T. W. Cline and P. Schedl. 1989. The Drosophila female-specific sex-determination gene, Sex-letilal, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. Genes Dev. 3: 708-719.

Sariola, H. and M. Saarma. 1999. GDNF and its receptors in the regulation of ureter branching. Int. J. Dev. Biol. 43: 413-418.

Schiebinger, L. 1989. The Mind Has No Sex? Harvard University Press, Cambridge, MA.

Shen, W.-H., C. C. D. Moore, Y. Ikeda, K. L. Parker and H. A. Ingraham. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian-inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. Cell 77: 651-661.

Siiteri, P. K. and J. D. Wilson. 1974. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 113-125.

Sinclair, A. H. and 9 others. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif Nature 346: 240-244.

Smith, C. A. and A. H. Sinclair. 2001. Sex determination in the chicken embryo. J. Exp. Zool. 290: 691-699.

Stevens, N. M. 1905. Studies in spermatogenesis with especial reference to the "accessory chromosome." Publication no. 36. Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.

Swain, A., V. Narvaez, P. Burgoyne, G. Camerino and R. Lovell-Badge. 1998. Daxl antagonizes Sry action in mammalian sex determination. Nature 391: 761-767.

Thigpen, A. E., D. L. Davis, J. Imperato-McGinley and D. W Russell. 1992. The molecular basis of steroid 5α-reductase deficiency in a large Dominican kindred. N. Engl. J. Med. 327: 1216-1219.

Tilmann, C. and B. Capel. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. Development 126: 2883-2890.

Tran, D., N. Meusy-Dessolle and N. Josso. 1977. Anti-Mullerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. Nature 269: 411-412.

Trelstad, R. L., A. Hayashi, K. Hayashi and P. K. Donahoe. 1982. The epithelial-mesenchymal interface of the male rate Mullerian duct: Loss of basement membrane integrity and ductal regression. Dev. Biol. 92: 27-40.

Tuana, N. 1988. The weaker seed. Hypatia 3: 35-59.

Vainio, S., M. Heikkila, A. Kispert, A. Chin and A. P. McMahon. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt4 signalling. Nature 397: 405 409.

Valcarcel, J., R. Singh, P. D. Zamore and M. R. Green. 1993. The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. Nature 362: 171-175.

Van Doren, H. M. Ellis and J. W. Posakony.1991. The Drosophila extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. Development 113: 245-255.

Vidal, V. P.I., M.-C. Chaboissier, D. G. de Rooij and A. Schedl. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. Nature Genet. 28: 216-217.

Wagner, T. and 13 others. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9.Cell 79: 1111-1120.

Washburn. L. L. and E. M. Eicher. 1989. Normal testis determination in the mouse depends on genetic interaction of a locus on chromosome 17 and theY chromosome. Genetics 123: 173-179.

Werner, M. H., J. R. Huth, A. M. Gronebom and G. M. Clore. 1995. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. Cell 81: 705-714.

Wibbels, T. and, D. Crews. 1994. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. J. Endocrinol. 141: 295-299.

Willingham, E., R. Baldwin, J. K. Skipper and D. Crews. 2000. Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal-kidney-gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. Gen. Comp. Endocr. 119: 202-207.

Wilson, E. B. 1905. The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. Science 22: 500-502.

Younger-Shepherd, S., H. Vaessin, E. Bier, L. Y. Jan and Y. N. Jan. 1992. deadpan, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in Drosophila sex determination. Cell 70: 911-922.

Zanaria, E. and 13 others. 1994. An unusual member of the nudear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature 372: 635-641.

Capítulo 18 Metamorfosis, regeneración y envejecimiento

El viejo orden cambió, dando lugar al nuevo.
ALFRED LORD TENNYSON (1886)

Los primeros estadios ligados a la tierra constituyen tractos digestivos enormes y los transportan por todos lados sobre pasos de oruga. Más tarde en la historia de vida, estos bienes podrán ser liquidados y reinvertidos en la construcción de un organismo enteramente nuevo; una máquina voladora dedicada al sexo.
CARROLL M. WILLIAMS (1958)

Daría mi brazo derecho por conocer los secretos de la regeneración.
OSCAR E. SCHOTTÉ (1950)

EL DESARROLLO NUNCA SE DETIENE. A lo largo de la vida, generamos continuamente nuevas células sanguíneas, linfocitos, queratinocitos y epitelio del tracto digestivo a partir de las células madre. Además de estos cambios continuos diarios, hay ejemplos en los que el desarrollo después de los estadios de embrión es obvio; a veces incluso sorprendente. Uno de estos ejemplos es la metamorfosis, la transición desde un estadio larval a un estadio adulto. En muchas especies que experimentan metamorfosis cambia una gran proporción de la estructura animal, y la forma larval y la del adulto de un mismo individuo son irreconocibles (véase fig. 2-4). Otro tipo sorprendente de desarrollo en el adulto es la regeneración, la creación de un nuevo órgano después de que el original ha sido extirpado. Algunas salamandras adultas, por ejemplo, pueden volver a desarrollar sus extremidades después de que estos apéndices han sido amputados.

La tercera categoría de cambios de desarrollo en los organismos adultos es un área más polémica. Ésta abarca aquellas alteraciones de formas asociadas con el envejecimiento. Algunos científicos creen que los procesos de degeneración no son adecuadamente parte del estudio de la biología del desarrollo. Otros investigadores indican patrones de envejecimiento específicos de especie determinados genéticamente y afirman que la gerontología, la ciencia del envejecimiento, estudia una parte importante del ciclo de la vida y por esta razón está correctamente incluida en la biología del desarrollo. Independientemente de su relación para el desarrollo normativo, metamorfosis, regeneración y envejecimiento son puestos en equilibrio para ser los temas críticos para la biología del siglo XXI.

Metamorfosis: la reactivación hormonal del desarrollo

En la mayoría de las especies de animales, el desarrollo embrionario lleva a un estadio larval con características muy diferentes de las del organismo adulto. Con bastante frecuencia, las formas larvales están especializadas para alguna función, tales como crecimiento o dispersión. La larva plútea del erizo de mar, por ejemplo, puede viajar por las corrientes oceánicas, mientras que el erizo adulto lleva una existencia sedentaria. Las larvas oruga de las mariposas y de las polillas (mariposas de la luz) están especializadas para alimentarse, mientras que sus formas adultas están especializadas para el vuelo y la reproducción, carecen con frecuencia de las partes de la boca para alimentarse. La división de funciones entre la larva y el adulto está a menudo sorprendentemente bien diferenciada (Wald 1981). Las polillas de *Cecropia*, por ejemplo, eclosionan desde huevos y se desarrollan como juveniles sin alas (orugas) por varios meses. Todo este desarrollo les permite pasar un día como insectos alados completamente desarrollados y aparearse (rápidamente) antes de morir. Los adultos nunca comen y en rea-

lidad no tienen partes de la boca durante su breve fase reproductiva del ciclo de vida. Como podría esperarse, las formas juveniles y del adulto viven frecuentemente en distintos ambientes.

Durante la metamorfosis, los procesos de desarrollo son reactivados por hormonas específicas y la totalidad del organismo cambia de manera morfológica, fisiológica y conductual para prepararse para este nuevo modo de existencia. Estos cambios no son únicamente de forma. En los renacuajos de anfibios, por ejemplo, la metamorfosis involucra la maduración de las enzimas hepáticas, de la hemoglobina y de los pigmentos del ojo, así como la remodelación del sistema nervioso y del aparato digestivo. Por lo tanto, la metamorfosis es a menudo un tiempo de cambios significativos de desarrollo que afectan a casi la totalidad del organismo.

Metamorfosis en los anfibios

Cambios morfológicos asociados con la metamorfosis

Los anfibios son denominados así por su capacidad para experimentar la metamorfosis; su nombre viene del griego *amphi* ("doble") y *bios* ("vida"). La metamorfosis de los anfibios está asociada generalmente con cambios morfológicos que preparan a un organismo acuático para una existencia primariamente terrestre. En los **urodelos** (salamandras), estos cambios incluyen la reabsorción de la aleta caudal, la destrucción de las branquias externas y un cambio en la estructura de la piel. En los **anuros** (ranas y sapos), los cambios metamórficos son más espectaculares, con casi cada órgano sujeto a modificaciones (cuadro 18-1; véase además fig. 2-4). Los cambios regresivos incluyen la pérdida de los dientes córneos del renacuajo y de las branquias internas, así como la destrucción de la cola. Al mismo tiempo, también son evidentes procesos constructivos tales como el desarrollo de la extremidad y la morfogénesis glandular dermoidea. Los medios de locomoción cambian a medida que se desarrollan las extremidades posteriores y las extremidades anteriores, y la cola en forma de pala experimenta regresión. El cráneo cartilaginoso del renacuajo es reemplazado por el cráneo predominantemente óseo de la rana. Los dientes córneos utilizados para romper plantas de la laguna desaparecen cuando la boca y la mandíbula toman una nueva forma y se desarrolla el músculo de la lengua. Mientras tanto, el intestino alargado característico de los herbívoros es remodelado para adaptarse a la dieta más carnívora de la rana adulta. Las branquias experimentan regresión y el arco branquial degenera. Los pulmones aumentan de tamaño, y se desarrollan músculos y cartílago para bombear aire hacia adentro y hacia afuera de los pulmones. El aparato sensorial cambia también, ya que el sistema de la línea lateral del renacuajo se degenera y el ojo y el oído experimentan una diferenciación posterior (véase Fritzsch y col. 1988). Se desarrolla el oído medio, como lo hace también la membrana timpánica característica de los oídos externos de la rana y del sapo. En el ojo, surgen las membranas nictitantes y los párpados.

Cuando un animal cambia su hábitat y modo de nutrición, se debería esperar que su mandíbula, tubo digestivo y sistema nervioso experimenten cambios drásticos y ciertamente esto es lo que sucede. Una consecuencia fácilmente observada de la metamorfosis de anuros es el

Cuadro 18-1 *Resumen de algunos cambios metamórficos en los anuros*

Sistema	Larva	Adulto
Locomotor	Acuático, aletas caudales	**Terrestre;** tetrápodo sin cola
Respiratorio	Branquias, piel, pulmones; **hemoglobinas larvarias**	**Piel, pulmones;** hemoglobinas del adulto
Circulatorio	Arcos aórticos, **aorta; venas yugulares anterior, posterior y común**	**Arco** carotídeo; arco sistémico; venas **cardinales**
Nutritivo	**Herbívoros: tubo digestivo largo y espiral; simbiontes intestinales; boca pequeña; mandíbulas córneas, dientes labiales**	**Carnívoros: tubo** digestivo corto; proteasas; **boca** grande con lengua larga
Nervioso	**Carencia de membrana nictitante, porfirospina, sistema de la línea lateral, neuronas de Mauthner**	Desarrollo **de los** músculos oculares, membrana nictitante, rodopsina; pérdida del **sistema de la** línea lateral, **degeneración de las neuronas** de Mauthner; membrana **timpánica**
Excretor	**Principalmente amoníaco, algo de urea (amonotélicos)**	**Principalmente** urea; elevada actividad de **las enzimas** del ciclo de la ornitina-urea **(ureotélicos)**
Tegumentario	**Delgada bicapa epidérmica con una delgada dermis; sin glándulas mucosas o glándulas granulares**	**Epidermis escamosa estratificada con queratinas del adulto; la dermis bien desarrollada contiene glándulas mucosas y glándulas granulares que secretan péptidos antimicrobianos**

Fuente: según Turner y Bagnara 1976 y Reilly y col. 1994.

movimiento de los ojos* hacia adelante desde su posición lateral original (fig. 18-1). Los ojos laterales del renacuajo son típicos de alimentación herbívora, mientras que los ojos de la rana localizados frontalmente corresponden a un estilo de vida más depredador. Para atrapar su presa, la rana necesita ver en tres dimensiones. Esto es, tiene que adquirir un campo de visión binocular por medio del cual las aferencias desde ambos ojos converjan en el cerebro (véase cap. 13). En el renacuajo, el ojo derecho inerva el lado izquierdo del cerebro y viceversa; no hay proyecciones homolaterales (del mismo lado) de las neuronas retinales. Sin embargo, durante la metamorfosis surgen estas vías homolaterales adicionales, que permiten que las aferencias desde ambos ojos alcancen la misma área del cerebro (Currie y Cowan 1974; Hoskins y Grobstein 1985a).

En *Xenopus*, estas nuevas vías neuronales no resultan del remodelamiento de neuronas existentes, sino de la formación de nuevas neuronas que se diferencian en respuesta a las hormonas tiroideas (Hoskins y Grobstein 1985a,b). La capacidad de estos axones para proyectar de manera homolateral resulta de la inducción de efrina B en el quiasma óptico por las hormonas tiroideas (Nakagawa y col. 2000). La efrina B también se encuentra en el quiasma óptico de mamíferos (que tiene proyecciones ipsilaterales durante toda la vida) pero no en el quiasma de peces y aves (que tienen solo proyecciones contralaterales). Como se muestra en el capítulo 13, las efrinas pueden repeler ciertas neuronas, haciendo que ellas proyecten en una dirección en lugar de la otra.

Algunas neuronas larvales, como ciertas neuronas motoras en la mandíbula del renacuajo, cambian sus afinidades desde el músculo larval hacia el músculo adulto recién formado (Alley y Barnes 1983). Aún otras neuronas, como las que inervan la lengua (un músculo recién formado no presente en la larva), se encontraban latentes durante el estadio de renacuajo y forman su primera sinapsis durante la metamorfosis (Grobstein 1987). Por lo tanto, el sistema nervioso de los anuros experimenta una enorme reestructuración durante la metamorfosis. Algunas neuronas mueren, otras nacen y otras cambian su especificidad.

La forma del cráneo también cambia de modo significativo y prácticamente cada componente estructural de la cabeza es remodelado (fig. 18-2; Trueb y Hanken 1992; Berry y col. 1998). El cambio más obvio es que se está produciendo nuevo hueso. El cráneo del renacuajo es primariamente cartilaginoso; el cráneo del adulto es primariamente óseo. Otro cambio extraordinario es la formación del maxilar inferior. Aquí el cartílago de Meckel se alarga hasta casi el doble de su longitud original y a su alrededor se forman los huesos dérmicos. Mientras está creciendo el cartílago de Meckel, las branquias y los cartílagos de los arcos branquiales (que han sido usados para la respiración en el agua) degeneran. Otro cartílago, tal como el cartílago ceratohial (que anclará la lengua), es ampliamente remodelado. Por lo tanto, como en el sistema nervioso, algunos elementos esqueléticos proliferan, algunos mueren y algunos son remodelados.

El intestino del *Xenopus* cambia espectacularmente, desde una estructura grande utilizada para la dieta de un renacuajo herbívoro hacia una estructura más corta característica de los carnívoros. La formación y diferenciación de este nuevo epitelio intestinal es desencadenada probablemente por la trascripción de los genes de *bmp-4* y *sonic hedgehog*. Las hormonas tiroideas activan el gen *shh* durante la metamorfosis (véase más adelante) en el intestino y en el estómago (Stolow y Shi 1995; Ishizuya-Oka y col. 2001). Por esta razón, la remodelación regional de los órganos formados durante la metamorfosis puede ser generada por la reaparición de algunos de los mismos factores paracrinos que modelaron aquellos órganos en el embrión.

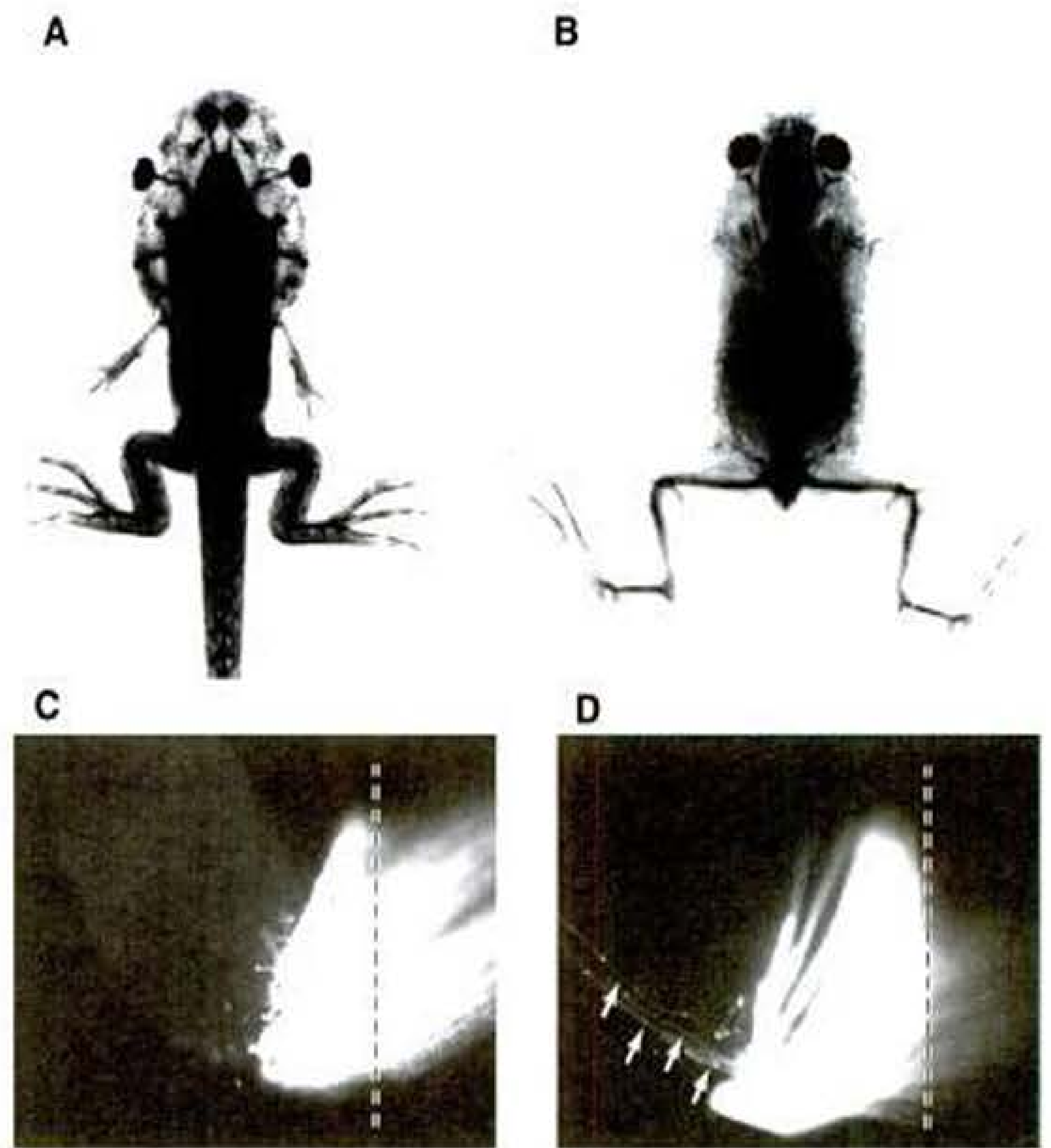


Fig. 18-1. Migración del ojo y cambios neuronales asociados durante la metamorfosis del renacuajo de *Xenopus laevis*. **A.** Los ojos del renacuajo están situados lateralmente, de modo tal que hay poco campo de visión binocular. **B.** Los ojos migran dorsalmente y rostralmente durante la metamorfosis creando un gran campo binocular para la rana adulta. **C, D.** Proyecciones retinales del renacuajo en metamorfosis. El colorante DiI fue colocado sobre un muñón cortado del nervio óptico para marcar la proyección retinal. **C.** En los estadios temprano y medio de la metamorfosis, los axones proyectan a través de la línea media (línea entrecortada) de un lado al otro del cerebro. **D.** En la metamorfosis tardía, la efrina-B es producida en el quiasma óptico a medida que se forman ciertas neuronas (flechas) que proyectan homolateralmente. (A, B, de Hoskins y Grobstein 1984; fotografías cortesía de P. Grobstein; C, D, de Nakagawa y col. 2000, fotografía cortesía de C. E. Holt.)

Cambios bioquímicos asociados con la metamorfosis

Además de los cambios morfológicos obvios, durante la metamorfosis se producen importantes transformaciones

* Uno de los movimientos más espectaculares de los ojos durante la metamorfosis se produce en los peces planos, como las platijas. Originalmente, los ojos están sobre lados opuestos de la cara. Sin embargo, durante la metamorfosis, uno de los ojos migra a través de la cabeza para encontrar el ojo del otro lado (véase Hashimoto y col. 2002). Esto permite al pez vivir sobre el fondo y mirar hacia arriba.

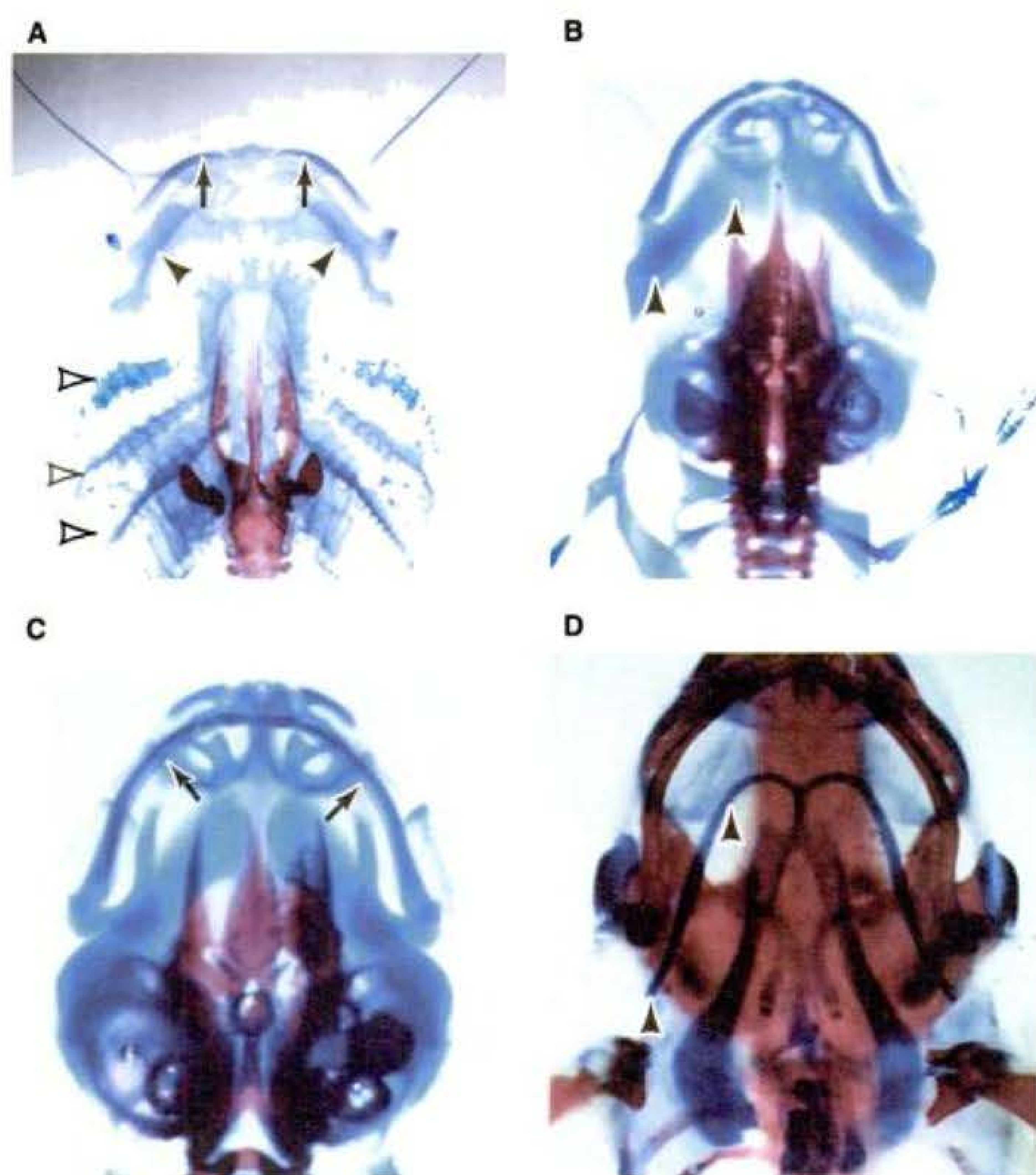


Fig. 18-2. Cambios en la cabeza de *Xenopus* durante la metamorfosis. Los embriones enteros fueron teñidos con alcian blue para teñir cartílago y alizarin red para teñir hueso. **A.** Antes de la metamorfosis, los cartílagos del arco branquial (cabezas de flecha abiertas) son prominentes, el cartílago de Meckel (flechas) está en el extremo de la cabeza y los cartílagos ceratohiales (cabeza de flechas) son relativamente anchos y están situados anteriormente. **B-D.** A medida que continúa la metamorfosis, desaparece el cartílago del arco branquial. El cartílago de Meckel se alarga, la mandíbula (hueso mandibular inferior) se forma alrededor del cartílago de Meckel y el cartílago ceratohial se estrecha y se localiza más posteriormente. (Según Berry y col. 1998, fotografías cortesía de D. D. Brown.)

bioquímicas. En renacuajos, como en peces de agua dulce, el principal fotopigmento retiniano es la porfiropsina. Durante la metamorfosis, el pigmento cambia a rodopsina, el fotopigmento característico de los vertebrados terrestres y marinos (Wald 1945, 1981; Smith-Gill y Carver 1981; Hanken y Hall 1988). La hemoglobina del renacuajo cambia hacia una hemoglobina del adulto que une oxígeno más lentamente y lo libera más rápidamente (McCutcheon 1936; Riggs 1951). Las enzimas del hígado también cambian; reflejan los cambios en el hábitat. Los renacuajos, como la mayoría de los peces de agua dulce, son **amonotélicos**; esto es, excretan amoníaco. Como en la mayoría de los vertebrados terrestres, muchas ranas adultas (como el género *Rana*, aunque no el más acuático *Xenopus*) son **ureotélicos**; ellos excretan urea, que requiere menos agua que la excreción de amoníaco. Durante la metamorfosis, el hígado comienza a sintetizar las enzimas del ciclo de la urea necesarias para crear urea desde dióxido de carbono y amoníaco (fig. 18-3; Cohen 1970; Atkinson y col. 1996).

Control hormonal de la metamorfosis en los anfibios

El control de la metamorfosis por las **hormonas tiroideas** fue demostrado por Gudernatsch (1912), quien descubrió que los renacuajos metamorfoseaban prematuramente cuando eran alimentados con polvo de glándula tiroidea de caballo. En un estudio complementario, Allen (1916) halló que cuando extirpaba o destruía el rudimento de la glándula tiroides de los renacuajos tempranos (llevando a cabo de este modo una tiroidectomía), las larvas nunca metamorfoseaban, sino que crecían hacia renacuajos gigantes. Estudios posteriores (Saxén y col. 1957; Kollros 1961; Hanken y Hall 1988) demostraron que las etapas secuenciales de la metamorfosis de anuros están reguladas por cantidades aumentadas de hormona tiroidea. Algunos acontecimientos (como el desarrollo de las extremidades) se producen de manera temprana, cuando la concentración de hormonas tiroideas es baja, mientras que otros acontecimientos (como la regresión de la cola y la remodelación del intestino) se producen de manera tardía, después de que las hormonas tiroideas han alcanzado altas concentraciones. Estas observaciones dieron origen al **modelo del umbral** por medio del cual los diferentes acontecimientos de la metamorfosis son desencadenados por diferentes concentraciones de hormonas tiroideas. Aunque este modelo sigue siendo útil, los estudios moleculares han demostrado que la metamorfosis en anfibios es en realidad más compleja.

Los cambios metamórficos del desarrollo de la rana son causados por: 1) la secreción de la hormona **tiroxina** (**T_4**) hacia la sangre por la glándula tiroides; 2) la conversión de la T_4 hacia una hormona más activa, la **triyodotironina** (**T_3**) por los tejidos blanco y 3) la degradación de la T_3 en los tejidos blanco (fig. 18-4). La T_3 se une a los **receptores nucleares de hormonas tiroideas** (**TR**) con mayor afinidad que la T_4 y hace que se conviertan en los activadores transcripcionales de la expresión del gen. Por lo tanto, los niveles de T_3 y TR en los tejidos blanco son esenciales para producir la respuesta metamórfica en ca-

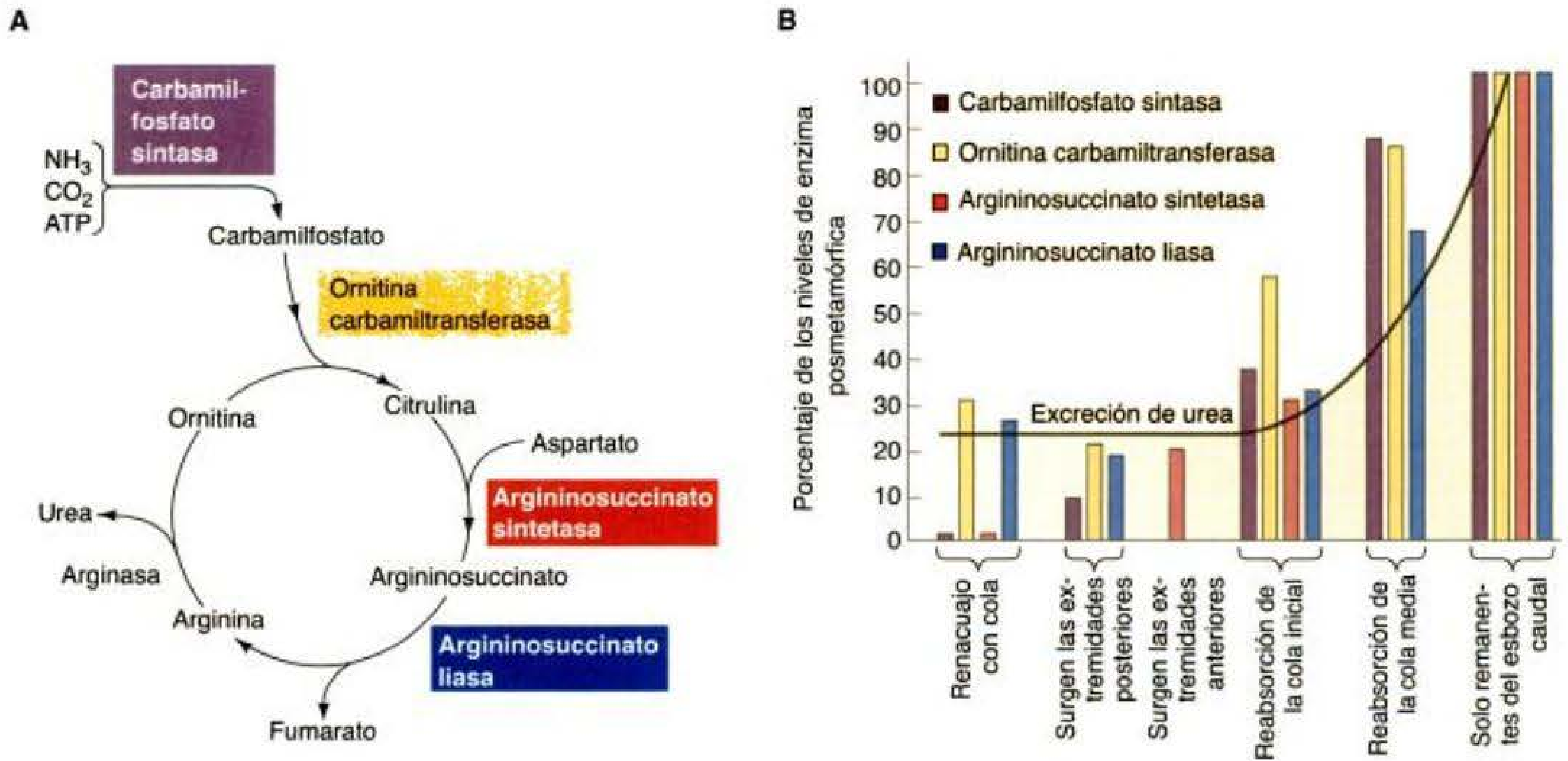


Fig. 18-3. Desarrollo del ciclo de la urea durante la metamorfosis del anuro. **A.** Principales características del ciclo de la urea por el cual los desechos nitrogenados son detoxificados y excretados con mínima pérdida de agua. **B.** La aparición de las actividades de las enzimas del ciclo de la urea se correlaciona con cambios metamórficos en la rana *Rana catesbeiana*. (Según Cohen 1970).

da tejido (Kistler y col. 1977; Robinson y col. 1977; Becker y col. 1977).

La concentración de T_3 en cada tejido está regulada por la concentración de T_4 en la sangre y por dos enzimas intracelulares críticas que eliminan los yodos de la T_4 y la T_3. La **deyodinasa tipo II** elimina un átomo de yodo del anillo externo del precursor (T_4) para convertirlo en la hormona más activa T_3. La **deyodinasa tipo III** elimina un átomo de yodo del anillo interno de la T_3 para convertirlo en un componente inactivo que finalmente será metabolizado a tirosina (Becker y col. 1997). Los renacuajos que están modificados genéticamente para sobreexpresar a la deyodinasa tipo III en sus tejidos blanco nunca completan la metamorfosis (Huang y col. 1999).

También hay dos tipos de receptores de hormonas tiroideas. En *Xenopus*, el **receptor α de hormona tiroidea (TRα**; del inglés, *thyroid hormone receptor α*) se encuentra ampliamente distribuido en todos los tejidos y está presente incluso antes de que el organismo tenga una glándula tiroides. El **receptor β de hormona tiroidea (TRβ)**, sin embargo, es el producto de un gen que es activado directamente por hormonas tiroideas. Los niveles de TRβ son muy bajos antes de la llegada de la metamorfosis, y como los niveles de hormona tiroidea aumentan durante la metamorfosis, también lo hacen los niveles intracelulares de TRβ (Yaoita y Brown 1990; Eliceiri y Brown 1994). Sin embargo, los TR no funcionan solos, sino que forman dímeros con el receptor de retinoide, RXR. Estos dímeros unen hormonas tiroideas y pueden llevar a cabo la transcripción (Mangelsdorf y Evans 1995; Wong y Shi 1995; Wolffe y Shi 1999). Se piensa que el complejo T_3-TR-RXR se une a la cromatina de sus genes de interés y activa a aquellos genes mediante un proceso que involucra la acetilación de histona (Sachs y col. 2001).

La metamorfosis con frecuencia está dividida en estadios. Durante el primer estadio, **premetamorfosis**, la glándula tiroides ha comenzado a madurar y está secretando bajos niveles de T_4 (y muy bajos niveles de T_3). El comienzo de secreción tiroidea de T_4 puede ser causado por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, que en mamíferos da comienzo a la respuesta de estrés). CRH puede actuar directamente sobre la hipófisis de la rana, instruyéndola a liberar hormona estimulante tiroidea (TSH; del inglés, *thyroid stimulating hormone*), o puede actuar de modo general haciendo a las células del cuerpo sensibles a bajas concentraciones de T_3 (Denver 1993, 2003). Los rudimentos de las extremidades, que tienen altos niveles de deyodinasa II y de TRα, pueden convertir T_4 en T_3 y utilizar a ésta inmediatamente a través del receptor TRα. Por lo tanto, durante el estadio temprano de la metamorfosis, los rudimentos de las extremidades son capaces de recibir hormona tiroidea y de utilizarla para comenzar el crecimiento de la pata (Becker y col. 1997; Huang y col. 2001; Schreiber y col. 2001).

A medida que madura la glándula tiroides, secreta más hormonas tiroideas. Este estadio se denomina **prometamorfosis**. Sin embargo, muchos de los principales cambios de la metamorfosis (como la reabsorción de la cola, la reabsorción de las branquias y la remodelación intestinal) tienen que esperar hasta el **clímax metamórfico**. En este momento, la concentración de T_4 aumenta espectacularmente y TRβ alcanza su nivel más alto dentro de las células. Debido a que uno de los genes blanco de T_3 es el gen TRβ, TRβ puede ser el principal receptor que media el clímax metamórfico. En la cola, hay solo una pequeña cantidad de TRα durante la premetamorfosis y la deyodinasa II entonces no es detectable. Sin embargo, durante la prometamorfosis, los niveles elevados de las hormonas tiroideas inducen altos niveles de TRβ. En el clímax metamórfico, se expresa la deyodinasa II y la cola comienza a ser reabsorbida. En este sentido, la cola experimenta su absorción solo *después* de que las patas son funcionales (de otro modo, el pobre anfibio no tendría

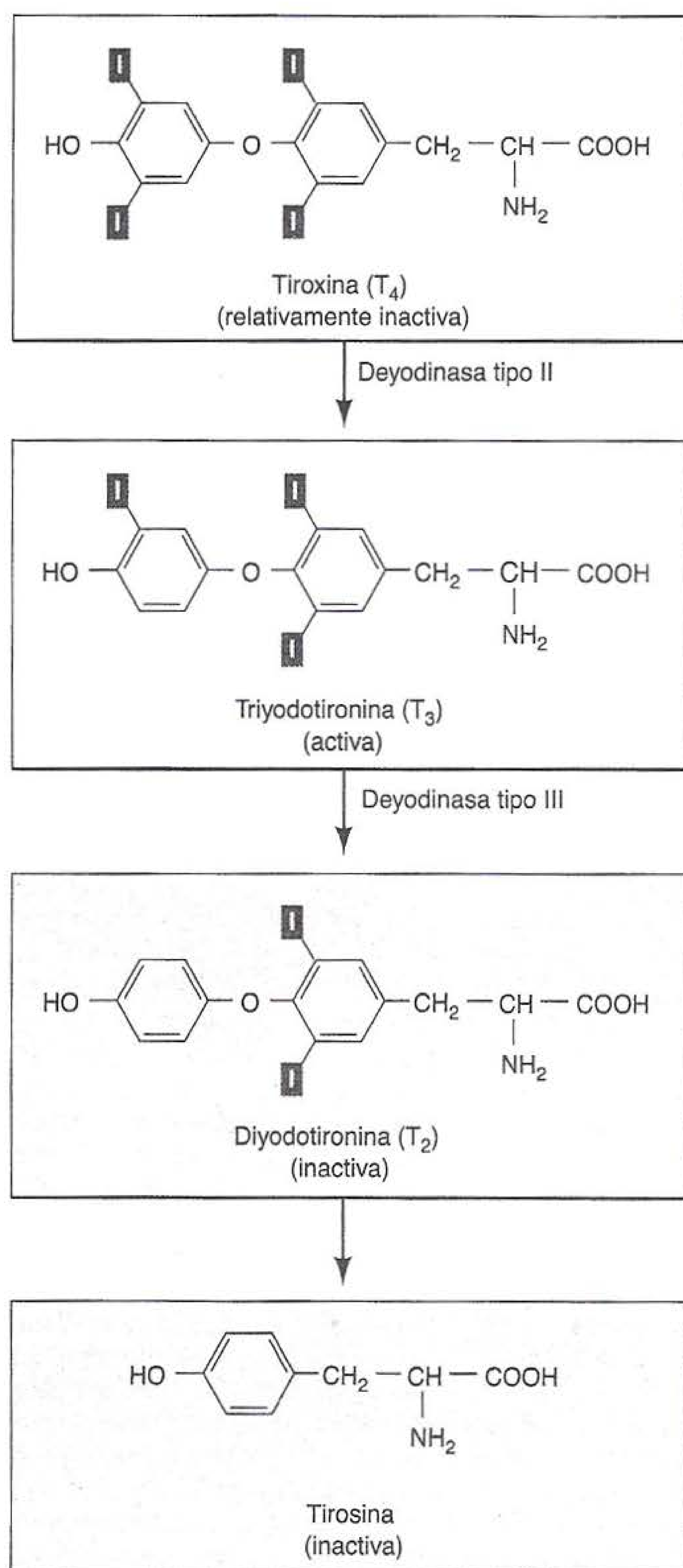


Fig. 18-4. Metabolismo de la tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3). La tiroxina sirve como una prohormona. Es convertida en los tejidos periféricos a la hormona activa T_3 por la deyodinasa II. La T_3 puede ser inactivada por la deyodinasa III, que convierte T_3 a diyodotironina y luego a tirosina.

medios de locomoción). La sabiduría de la rana es simple: nunca deshacerse de su cola antes de que sus patas estén funcionando.

Mientras tanto, algunos tejidos no parecen responder a las hormonas tiroides. Estos tejidos están protegidos por altas concentraciones de deyodinasa III. Por ejemplo, las hormonas tiroideas instruyen a la retina *ventral* a expresar efrina-B y a generar las neuronas homolaterales mostradas en la figura 18-1D. La retina *dorsal* no responde a las hormonas tiroideas y no genera neuronas. La retina dorsal parece ser aislada de las hormonas tiroideas mediante la expresión de deyodinasa III, que degrada la T_3 producida por la deyodinasa II. Si la deyodinasa III es activada en la retina ventral, las neuronas no proliferarán durante la metamorfosis y no se formarán los axones homolaterales (Marsh-Armstrong y col. 1999; Kawahara y col. 1999).

Otro órgano que experimenta cambios durante la metamorfosis de una rana es su cerebro y una de las funciones del cerebro es regular en menos la metamorfosis una vez que se ha alcanzado el clímax metamórfico. Finalmente, las hormonas tiroideas producen una retroalimentación negativa: inhiben a las células de la hipófisis que instruyen la producción de hormonas tiroideas (Saxén y col. 1957; Kollros 1961; White y Nicoll 1981). Huang y colegas (2001) han demostrado recientemente que en el clímax de la metamorfosis, se observa la expresión de deyodinasa en aquellas células de la hipófisis anterior que secretan tirotrofina, la hormona que activa la expresión de hormona tiroidea. La T_3 resultante suprime la transcripción del gen de la tirotrofina, iniciando de este modo el asa de retroalimentación negativa de modo tal que se produce menos hormona tiroidea.

Programas de desarrollo regionalmente específicos

Mediante la regulación de las concentraciones de T_3 y TR en sus células, las diferentes regiones del cuerpo pueden responder a diferentes tiempos a las hormonas tiroideas. El tipo de respuesta (proliferación, apoptosis, migración) está determinado por otros factores ya presentes en los diferentes tejidos. Los mismos estímulos hacen que algunos tejidos degeneren mientras provocan que otros se desarrollen y se diferencien, como se ejemplificó mediante el proceso de degeneración de la cola.

La degeneración de las estructuras de la cola es relativamente rápida, debido a que el esqueleto óseo no se extiende hasta la cola, que es sustentada solamente por la notocorda (Wassersug 1989). La regresión de la cola es llevada a cabo por apoptosis. Después de que se produce la muerte celular, los macrófagos se acumulan en la región de la cola, digiriendo los desechos con sus propias enzimas, especialmente colagenasas y metaloproteinasas. El resultado es que la cola se convierte en un gran saco de enzimas proteolíticas (fig. 18-5; Kaltenbach y col. 1979; Oofusa y Yoshizato 1991; Patterson y col. 1995).

La epidermis de la cola actúa de modo diferente que la epidermis de la cabeza o la del tronco. Durante el clímax metamórfico, la piel de la larva es instruida a experimentar apoptosis. La cabeza y el cuerpo del renacuajo son capaces de generar una nueva epidermis desde las células madre epiteliales. Sin embargo, la epidermis de la cola, carece de estas células madre y no puede generar nueva piel (Suzuki y col. 2002).

Las respuestas específicas de órgano a las hormonas tiroideas han sido demostradas de manera espectacular mediante el trasplante de un extremo de la cola a la región del tronco o al colocar una cúpula óptica en la cola (Schwind 1933, Geigy 1941). El extremo de la cola colocado en el tronco no está protegido de la degeneración, pero el ojo conserva su integridad a pesar de que se en-

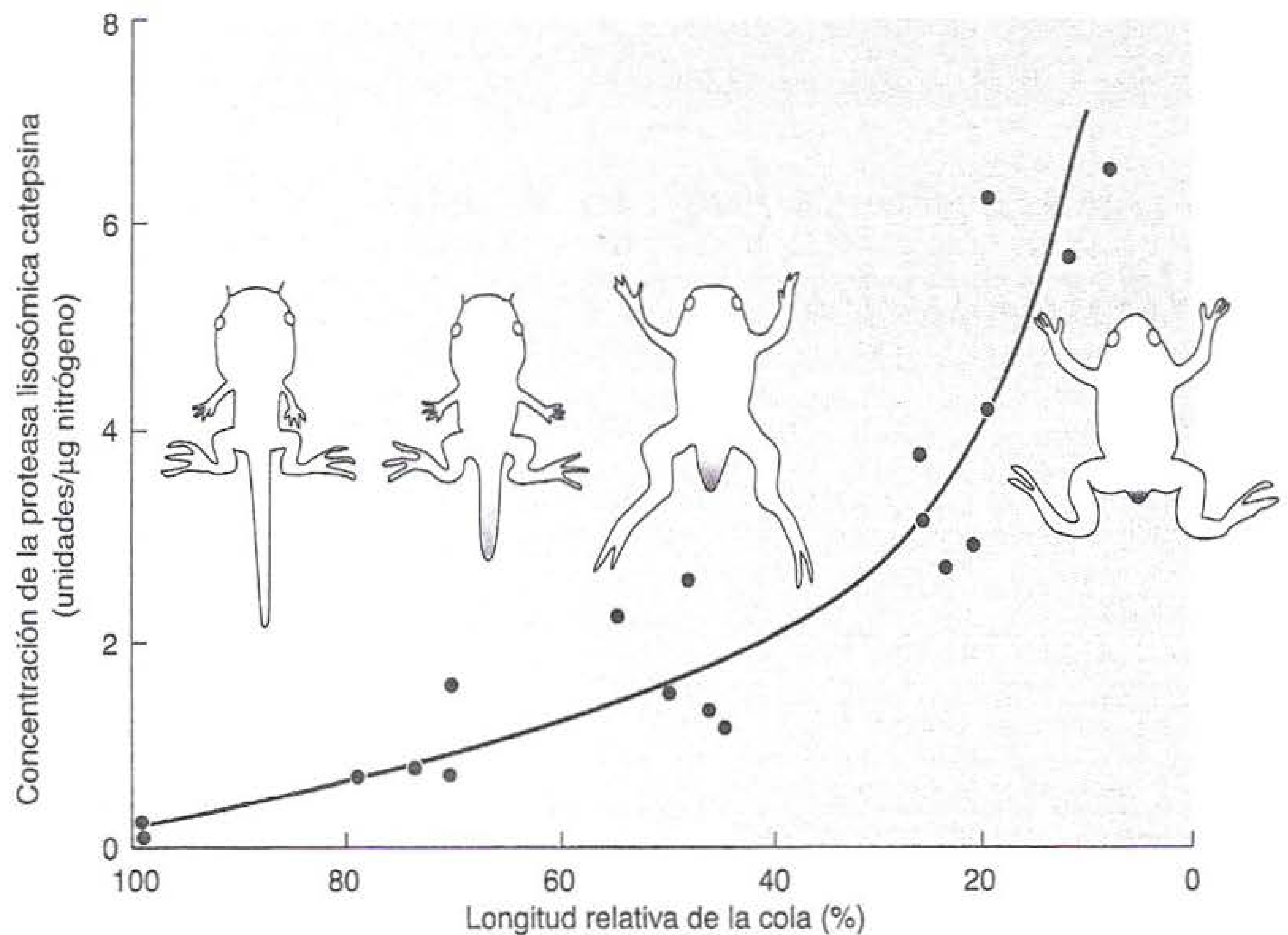


Fig. 18-5. Incremento en la actividad proteásica lisosómica durante la regresión de la cola en *Xenopus laevis*. Se piensa que las enzimas lisosómicas son responsables de digerir las células de la cola. (Según Karp y Berrill 1981.)

cuentra dentro de la cola en degeneración (fig. 18-6). Por lo tanto, la degeneración de la cola representa una respuesta de muerte celular programada específica de órgano. Cuando se da la señal, solo mueren tejidos específicos. Esta muerte celular programada es importante para modelar el cuerpo. Curiosamente, la degeneración de la cola humana durante la cuarta semana de gestación se asemeja a la regresión de la cola del renacuajo (Fallon y Simandl 1978).

VADE MECUM[2] **La metamorfosis en los anfibios y las llamadas de rana (Amphibian metamorphosis and frog calls).** Para fotografías de la metamorfosis de anfibios (y para los sonidos de las ranas adultas), revisar las secciones de la metamorfosis y de las llamada de rana del CD-ROM. **[Hacer clic sobre Amphibian]**

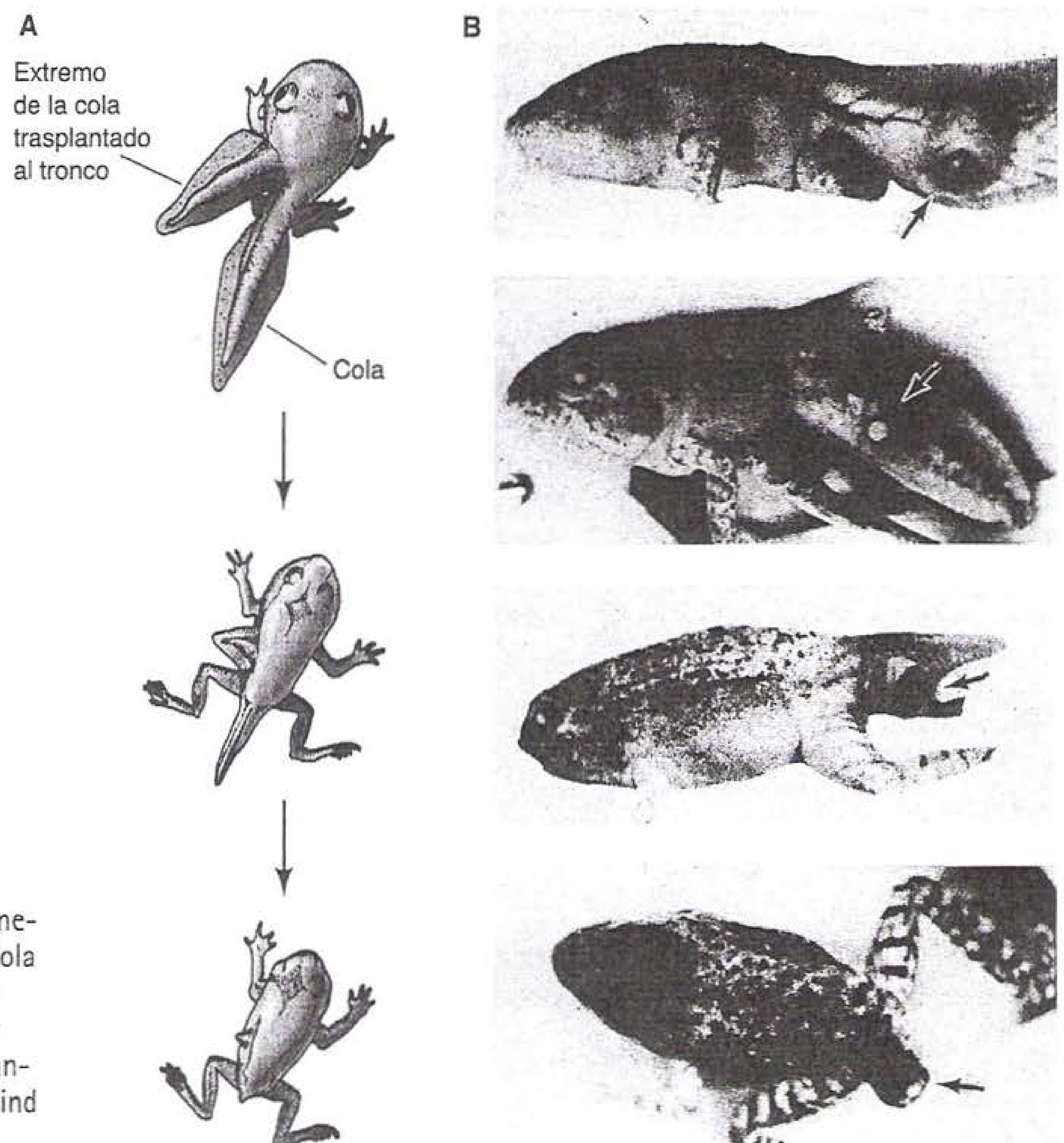


Fig. 18-6. Especificidad regional durante la metamorfosis de la rana. **A.** Los extremos de la cola experimentan regresión aun cuando son trasplantados al tronco. **B.** Las cúpulas ópticas se conservan intactas incluso cuando son trasplantadas hacia la cola en regresión. (Según Schwind 1933.)

Información adicional y especulaciones

Variaciones sobre el tema de la metamorfosis en los anfibios

Heterocronía

La mayoría de las especies de animales se desarrollan atravesando un estadio larval. Sin embargo, algunas especies han modificado sus ciclos de vida al extender o acortar enormemente su período larval. El fenómeno por medio del cual los animales cambian el tiempo relativo de aparición y el ritmo de desarrollo de los caracteres presentes en sus antepasados es denominado **heterocronía**. Aquí se discutirán tres tipos extremos de heterocronía.

1. La **neotenia** se refiere a la conservación de la forma juvenil debido al retardo del desarrollo corporal en relación con las células germinales y las gónadas, que consiguen la madurez en el tiempo normal.
2. La **progénesis** también involucra la conservación de la forma juvenil, pero en este caso, las gónadas y las células germinales se desarrollan a un ritmo más rápido que el normal y llegan a ser sexualmente maduras mientras que el resto del cuerpo está todavía en una fase juvenil.
3. En el **desarrollo directo**, el embrión abandona los estadios de desarrollo enteramente larval y continúa construyendo un pequeño adulto.

Neotenia

En ciertas salamandras, la madurez sexual se produce en lo que es frecuentemente considerado un estadio larval. El sistema reproductivo y las células germinales maduran, pero el resto del cuerpo conserva su forma juvenil durante toda la vida. En la mayoría de tales especies, la metamorfosis no se produce y la madurez sexual tiene lugar en un cuerpo "larval." El axolote mexicano, *Ambystoma mexicanum*, no experimenta metamorfosis en la naturaleza debido a que su glándula hipófisis no libera una tirotrofina (hormona estimulante de la tiroides) para activar la síntesis de T_3 en sus glándulas tiroideas (Prahlad y DeLanney 1965; Norris y col. 1973; Taurog y col. 1974).

Cuando los investigadores le administraron hormonas tiroideas o tirotrofina a *A. mexicanum*, hallaron que la salamandra metamorfoseaba hacia una forma adulta que no se observa en la naturaleza (fig. 18-7; Huxley 1920). Otra especie, como *A. tigrinum*, metamorfosea solo en respuesta a señales desde el ambiente. Como parte de su ámbito, *A. tigrinum* es una salamandra neoténica, chapoteando en su camino a través de las lagunas frías de las Montañas Rocallosas. Sus gónadas y células germinales maduran y las salamandras se aparean satisfactoriamente mientras que el resto del cuerpo conserva su forma larval. Sin embargo, en las regiones más cálidas de su ámbito, la forma larval es transitoria, llevando a una salamandra tigre adulta de vida terrestre. Los individuos de poblaciones montañosas neoténicas de *A. tigrinum* pueden ser inducidos a experimentar metamorfosis simplemente al colocarlos en agua cálida. Parece ser que, en estas especies, algunas partes de los procesos metamórficos de las salamandras no funcionarán a bajas temperaturas. Algunas salamandras son permanentemente neoténicas, incluso en el laboratorio. Mientras que T_3 es capaz de producir formas adultas del *A. mexicanum* que no estaban presentes, las especies neoténicas de *Necturus* y *Siren* se mantienen sin responder a las hormonas tiroideas (Frieden 1981); su neotenia es permanente.

Las bases moleculares de esta heterocronía son desconocidas. De Beer (1940) y Gould (1977) han especulado que la neotenia es el principal factor en la evolución de los taxa más complejos. Mediante el retraso del desarrollo de los tejidos somáticos, la neotenia puede dar a la selección natural un sustrato flexible. De acuerdo con Gould (1977, p. 283), la neotenia puede "proporcionar un escape a la especialización. Los animales pueden renunciar a sus formas adultas altamen-





Fig. 18-7. Metamorfosis en *Ambystoma*. **A.** *Ambystoma* adulto normal, con branquias prominentes y una amplia cola. **B.** *Ambystoma* metamorfoseado que no se observa en las poblaciones naturales. Se hizo crecer a este individuo en agua suplementada con tiroxina. Sus branquias han experimentado regresión y su piel ha cambiado significativamente. (Fotografía cortesía de K. Crawford.)

te especializadas y regresar a la labilidad del joven y prepararse para nuevas direcciones evolutivas."

Progénesis

En la progénesis, se acelera la maduración gonadal mientras que el resto del cuerpo se desarrolla normalmente hasta un cierto estadio. La progénesis le ha permitido a algunas especies de salamandras encontrar nuevos nichos ecológicos. *Bolitoglossa occidentalis* es una salamandra tropical que, a diferencia de otros miembros de su género, vive en árboles. Las membranas interdigitales de los pies y el pequeño tamaño corporal de estas salamandras resultan convenientes para su existencia arbórea, las membranas interdigitales de los pies que producen la succión para trepar y el pequeño cuerpo generan esa tracción eficiente. Alberch y Alberch (1981) han demostrado que *B. occidentalis* se asemeja a las formas juveniles de las especies relacionadas *B. subpalmata* y *B. rostrata* (cuyos jóvenes son pequeños, con dígitos que todavía no han crecido para pasar sus membranas interdigitales; véase fig. 23-18). *B. occidentalis* alcanza la madurez sexual a un tamaño mucho menor que sus parientes y esto parece que le ha dado un fenotipo que hace posible la vida en los árboles.

Desarrollo directo

Mientras que algunos animales han extendido su período de vida larval, otros han "acelerado" su desarrollo al abandonar sus formas larvales "normales." Este último fenómeno, denominado **desarrollo directo**, esta representado por especies de rana que carecen de renacuajos y por erizos de mar que carecen de larva plútea. Elinson y sus colegas (del Pino y Elinson 1983; Elinson 1987) han estudiado al *Eleutherodactylus coqui*, una pequeña rana que es uno de los vertebrados más abundantes sobre la isla de Puerto Rico. A diferencia de los huevos de *Rana* y de *Xenopus*, los huevos de *E. coqui* están fecundados mientras todavía se encuentran dentro del cuerpo de la hembra. Cada huevo tiene cerca de 3,5 mm de diámetro (aproximadamente 20 veces el volumen de un huevo de *Xenopus*). Después de que se ha depositado el huevo, el macho cuidadosamente se sienta sobre los embriones en desarrollo, protegiéndolos de los depredadores y de la desecación (Taigen y col. 1984).

El desarrollo temprano de *E. coqui* es como el de la mayoría de las ranas. La segmentación es holoblástica, la gastrulación es iniciada en una posición subecuatorial y los pliegues neurales llegan a elevarse desde la superficie. Sin embargo, poco después del cierre del tubo neural, los esbozos de las extremidades aparecen sobre la superficie (fig. 18-8A, B). Este surgimiento temprano de los esbozos de las extremidades es la primera indicación de que el desarrollo es directo y que no pasará a través de un estadio de renacuajo sin extremidades. Además, el desarrollo de *E. coqui* es modificado de modo tal que el modelado de la mayor parte de sus características –incluyendo sus extremidades– no depende de hormonas tiroideas. Sin embargo la glándula tiroides se desarrolla y las hormonas tiroideas parecen ser críticas para la eventual reabsorción de la cola (que es utilizada como un órgano respiratorio, no como locomotor) y el riñón primitivo (Lynn y Peadon 1955). Parece que la fase dependiente de la glándula tiroides es rechazada en el crecimiento embrionario (Hanken y col. 1992; Callery y col. 2001). Lo que surge de la gelatina del huevo 3 semanas después de la fecundación no es un renacuajo, sino una pequeña rana (fig. 18-8C). Tal desarrollo directo de la rana no necesita lagunas para sus estadios larvales y puede, de esta forma, colonizar hábitat que son inaccesibles para otras ranas. El desarrollo directo también se produce en otro phyla, que también está correlacionado con un huevo de gran tamaño. Parece que si la nutrición puede ser proporcionada en el huevo, el ciclo de vida no necesita un estadio larval de recolección de comida.

Comportamientos de cría de los renacuajos

La mayoría de las ranas de zonas templadas no invierten en proporcionar tiempo o energía a sus renacuajos. Sin embargo, entre las ranas tropicales, hay numerosas especies en las que las ranas adultas llevan a cabo meticulosos cuidados de sus renacuajos. Un ejemplo es la rana flecha venenosa, *Dendrobates*, hallada en las selvas tropicales de Centroamérica. La mayor parte del tiempo, estas ranas altamente tóxicas viven en los lechos de hojas del suelo de la selva. Luego de que los huevos son depositados en las hojas húmedas, un progenitor (a veces el macho, a veces la hembra) se mantiene custodiando los huevos. Si el terreno no se vuelve demasiado seco, la rana orinará sobre los huevos para mantenerlos húmedos. Cuando los huevos maduran hacia renacuajos, el progenitor que los custodia les permite ser-

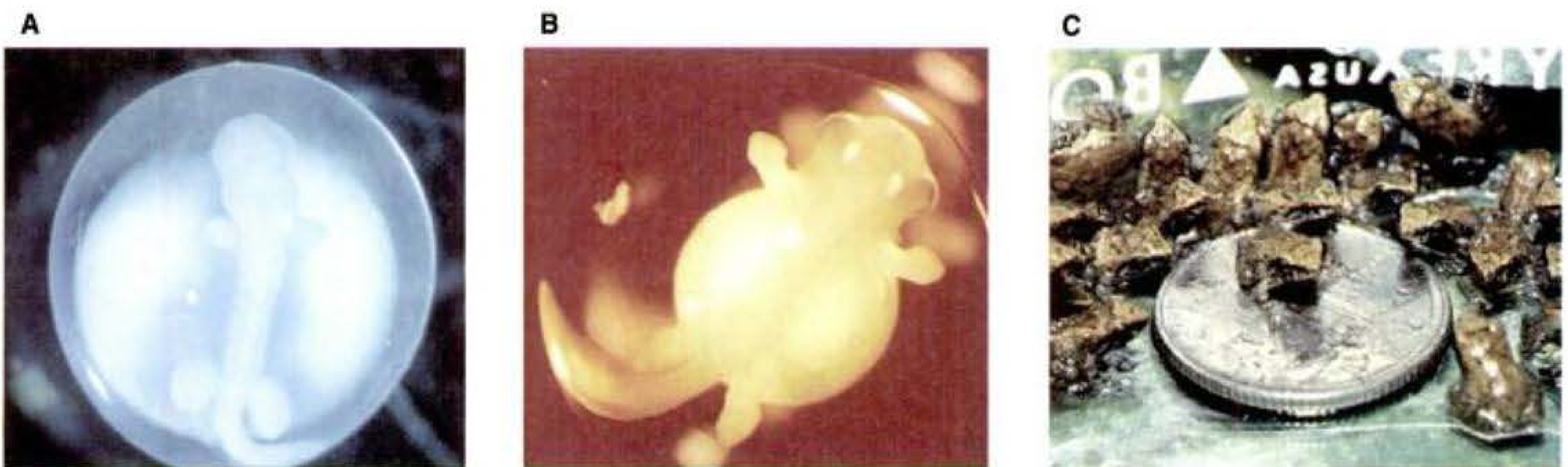


Fig. 18-8. Desarrollo directo de la rana *Eleutherodactylus coqui*. **A.** Los esbozos de las extremidades se observan a medida que el embrión se desarrolla sobre el vitelo. **B.** A medida que se agota el vitelo, las extremidades se observan más fácilmente. **C.** Tres semanas después de la fecundación, eclosionaron diminutas ranas. Ellas se observan aquí en una placa de petri y sobre una moneda canadiense de 10 centavos. (Fotografía cortesía de R. P. Elinson.)

pentear sobre su espalda (fig. 18-9A). Luego, la rana trepa al dosel de la selva tropical hasta alcanzar un *bromeliad* con una pequeña charca de agua en la base de sus hojas. Aquí deposita uno de sus renacuajos, luego regresa por otro y así sucesivamente, hasta que la camada ha sido colocada en numerosas pequeñas charcas. Luego, cada día, la hembra regresa a estas charcas y deposita un pequeño número de huevos sin fecundar en estas, reabasteciendo la reducción de los sustentos nutritivos para los renacuajos hasta que finalicen la metamorfosis (Mitchell 1988; van Wijngaarden y Bolanos 1992; Brust 1993). No se sabe cómo la rana hembra recuerda –o si es informada a cerca de esto– dónde han sido depositados los renacuajos.

Las ranas marsupiales llevan los huevos en desarrollo en depresiones de la piel y a menudo anidan los renacuajos en sus bocas. Cuando los renacuajos experimentan la metamorfosis, las ranas escupen la progenie. Incluso más impresionante, las ranas de anidación gástrica de australia, *Rheobatrachus silus* y *R. vitellinus*, comen sus huevos. Los huevos se desarrollan a larvas y luego las larvas experimentan metamorfosis en el estómago de la madre. Cerca de 8 semanas después de haber sido tragados vivos, cerca de dos docenas de pequeñas ranas surgen desde la boca de la hembra (fig. 18-9B; Corben y col. 1974; Tyler 1983). ¿Qué detiene la digestión o la excreción de los huevos de *Rheobatrachus*? Parece que los huevos secretan prostaglandinas que detienen la secreción ácida y evitan las contracciones peristálticas en el estómago (Tyler y col. 1983). Durante este tiempo el estómago es fundamentalmente un útero y la rana no come. Luego del nacimiento oral, la morfología y la función del estómago de la madre vuelven a ser normales. Lamentablemente, se teme que ambas de estas destacables especies de rana ahora estén extinguidas. Ningún miembro de estas especies se ha visto desde mediados de 1980.

A



B

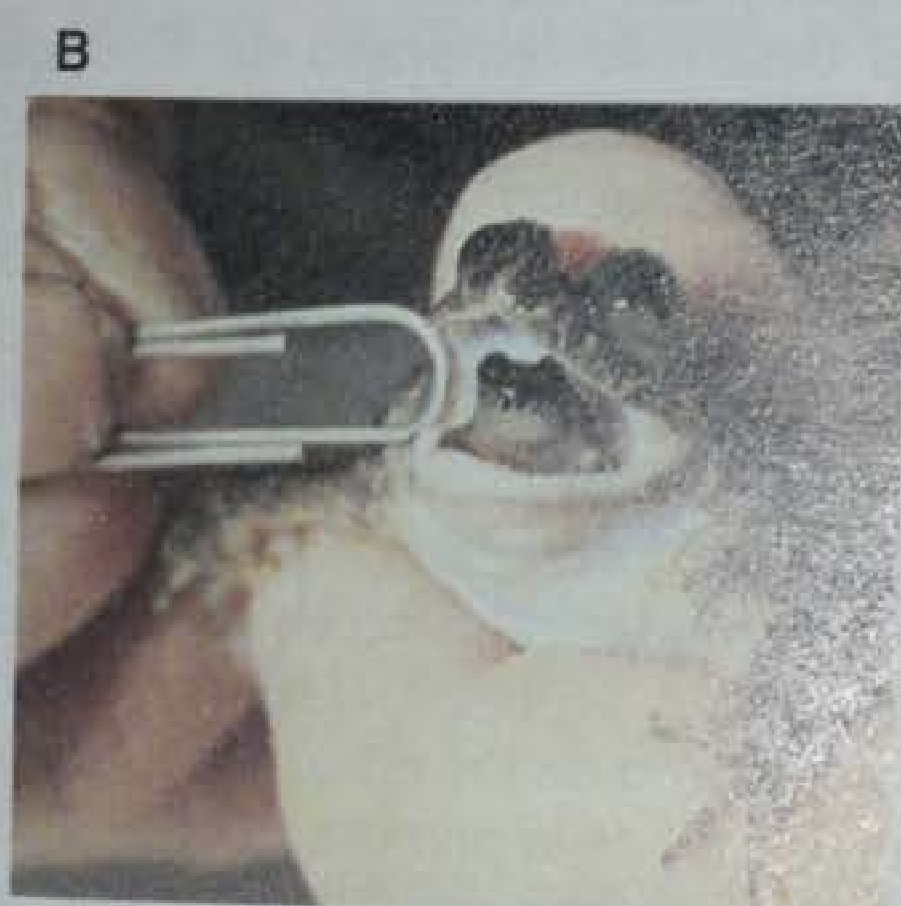


Fig. 18-9. Cuidados parentales de los renacuajos. **A.** Los renacuajos de la rana flecha venenosa *Dendrobates* son transportados por sus padres de regreso a las pequeñas charcas de agua en el dosel de la selva tropical peruana. **B.** Esta hembra de *Rheobatrachus* de Australia anida cerca de una docena de renacuajos en su estómago. Ellos surgen después de completar la metamorfosis. La última vez que alguien vio a una rana *Rheobatrachus* viva fue en 1985. (**A**, fotografía y M. Fogden/© M. y P. Fogden/Corbis; **B**, fotografía cortesía de M. Tyler.)

Metamorfosis en los insectos

Tipos de metamorfosis en los insectos

Mientras que la metamorfosis en los anfibios está caracterizada por la remodelación de los tejidos existentes, la metamorfosis en los insectos involucra primariamente la destrucción de los tejidos larvales y su reemplazo por una población de células completamente diferente. Los insectos crecen mediante mudas –despojarse de la cutícula– y la formación de una nueva cutícula a medida que aumentan de tamaño. Hay tres patrones principales de desarrollo de insectos. Unos pocos insectos, como los springtails y las moscas de mayo no tienen estadio larval y experimentan desarrollo directo. Éstos son denominados insectos **ametábolos** (fig. 18-10A). Estos insectos tienen un estadio de **proninfa** inmediatamente después de la eclosión y llevan las estructuras que les han permitido salir del huevo. Pero después de un estadio transitorio, el insecto comienza a parecerse a un pequeño adulto; después de cada muda, éste es más grande pero no ha cambiado de forma (Truman y Riddiford 1999). Otros insectos, especialmente saltamontes y chinches, experimentan una metamorfosis gradual **hemimetábolos** (fig. 18-10B). Después de atravesar por un período muy breve como proninfa (cuya cutícula se desprende con frecuencia cuando el insecto eclosiona), el insecto se parece a un adulto inmaduro. Este estadio inmaduro es denominado **ninfa**. Están presentes los rudimentos de las alas, los órganos genitales y otras estructuras del adulto y estas estructuras llegan a ser más maduras con cada muda. En la última muda, el insecto que surge es un adulto alado y sexualmente maduro (**imago**).

Los insectos **holometábolos** como las moscas, escarabajos, polillas y mariposas, no tienen estadio de proninfa (fig. 18-10C). La forma juvenil que eclosiona desde el huevo se denomina **larva**. La larva (una oruga, gusano o cresa) experimenta una serie de mudas a medida que ésta se vuelve más grande. Los estadios entre estas mudas larvales se denominan **instars** (o estadios). El número de mudas antes de llegar a ser un adulto es característico de especie, aunque los factores ambientales pueden aumentar o disminuir el número. Los instars larvales crecen de manera escalonada, cada etapa es más larga que la anterior. Finalmente, hay una transformación espectacular y rápida entre los estadios larvales y adultos. Después del instar o estadio final, la larva experimenta una **muda metamórfica** para convertirse en una **pupa**. La pupa no se alimenta y su energía debe provenir de aquellos alimentos que ésta ingiere como larva. Durante la pupación, se forman las estructuras adultas y se reemplazan las estructuras larvales. Finalmente, una **muda imaginal** le permite al adulto (**imago**) desprender el estuche pupal y emerger. Mientras que se dice que la larva *eclosiona* de un huevo, el adulto se dice que *eclosiona* desde la pupa.

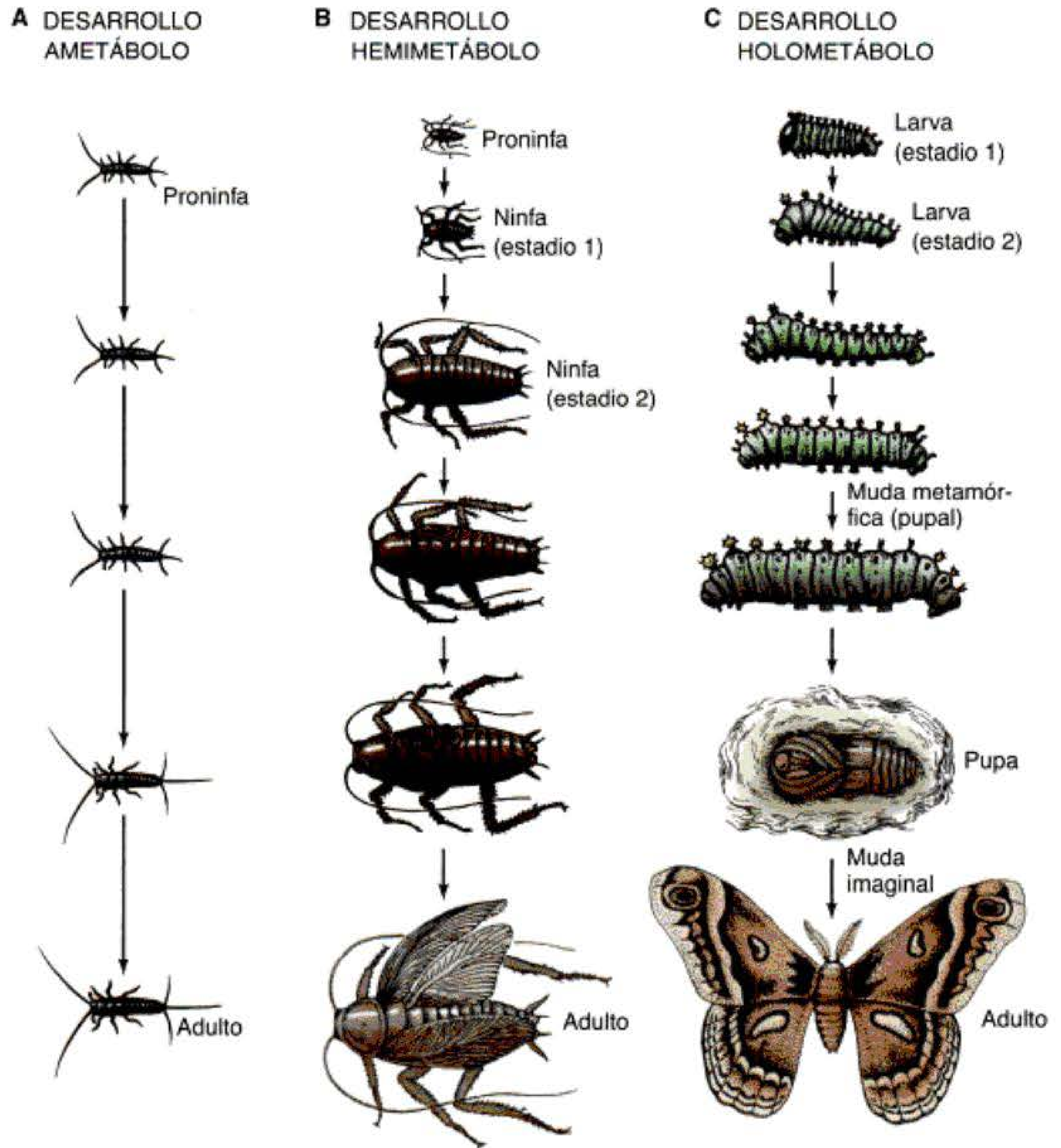


Fig. 18-10. Modos de desarrollo de insectos. Las mudas son representadas como flechas. **A.** Desarrollo ametábolo (directo) en lepisma. Después de un breve estadio de proninfa, el insecto se parece a un adulto pequeño. **B.** Metamorfosis hemimetábola (gradual) en una cucaracha. Después de una fase muy breve de proninfa, el insecto se convierte en ninfa. Después de cada muda, el siguiente estadio ninfal se parece más a un adulto; alas y órganos genitales crecen gradualmente. **C.** Metamorfosis holometábola (completa) en una polilla. Después de eclosionar como una larva, el insecto experimenta sucesivas mudas larvales hasta que una muda metamórfica hace que éste ingrese al estadio pupal. Luego, una muda imaginal lo transforma en adulto.

Discos imaginales

En los insectos holometábolos, la transformación desde un juvenil hacia un adulto se produce dentro de la cutícula pupal. La mayor parte del cuerpo antiguo de la larva es destruido sistemáticamente mediante muerte celular programada, mientras que se desarrollan nuevos órganos del adulto desde nidos indiferenciados de **células imaginales**. Por lo tanto, dentro de cualquier larva, hay dos poblaciones celulares distintas: las células de la larva, que son utilizadas para las funciones del insecto juvenil y miles de células imaginales, que se localizan dentro de la larva en grupos en espera de la señal para diferenciarse.

Hay tres tipos principales de células imaginales:

1. Los **discos imaginales**, cuyas células formarán las estructuras cuticulares del adulto e incluyen: las alas, las patas, las antenas, los ojos, la cabeza, el tórax y los genitales (fig. 18-11).
2. Los **nidos histoblásticos** son grupos de células imaginales que formarán el abdomen del adulto.
3. Los grupos de células imaginales dentro de cada órgano, que proliferarán para formar el órgano adulto a medida que el órgano larval degenera.

Los discos imaginales pueden observarse en las larvas recién eclosionadas como engrosamientos locales de la epidermis. Mientras que la mayoría de las células de la larva tiene una capacidad mitótica muy limitada, los discos imaginales se dividen rápidamente en momentos específicos característicos. A medida que las células proliferan, forman un epitelio tubular que se pliega sobre sí mismo en una espiral compacta (fig. 18-12). El disco más grande, el del ala, contiene unas 60.000 células, mientras que los discos de la pata y del halterio contienen cerca de 10.000 células cada uno (Fristrom 1972). En la metamorfosis, estas células proliferan, se diferencian y evierten (fig. 18-12B).

El mapa de destino y la secuencia de eversión del disco de la pata de *Drosophila* se muestran en la figura 18-13. Al final del tercer instar, justo antes de la pupación, el disco de la pata es un saco epitelial conectado por un delgado tallo a la epidermis de la larva. Sobre un lado del saco, el epitelio se enrosca en una serie de pliegues concéntricos "que recuerda a un pastel danés" (Kalm y col. 1995). A medida que comienza la pupación, las células del centro del disco se telescopan hacia fuera para convertirse en las porciones más distales de la pata –las garras y el tarso. Las células externas se convierten en las estructuras proximales: la coxa y la epidermis adyacente (Schubiger 1968). Después de diferenciarse, las células de los apéndices y de la epidermis secretan una cutícula apropiada para esta región específica. Aunque el disco está compuesto primariamente de células epidérmicas,

Discos para:
Partes de la boca
Placa frontal y labio superior
Antena
Ojo
Pata
Ala
Genitales
Células imaginales del intestino anterior
Histioblastos
Células imaginales del intestino medio
Traqueoblastos imaginales
Células imaginales del intestino posterior
Cabeza
Tórax
Abdomen
Larva de *Drosophila*
Metamorfosis
Adulto de *Drosophila*

Fig. 18-11. Localizaciones y destinos de desarrollo de los discos imaginales y de los tejidos imaginales en el tercer estadio de larva de *Drosophila melanogaster*. (Según Kalm y col. 1995.)

un pequeño número de **células adepiteliales** migran hacia el disco en el desarrollo temprano. Durante el estadio pupal, estas células dan origen a los músculos y nervios que sirven para esta estructura.

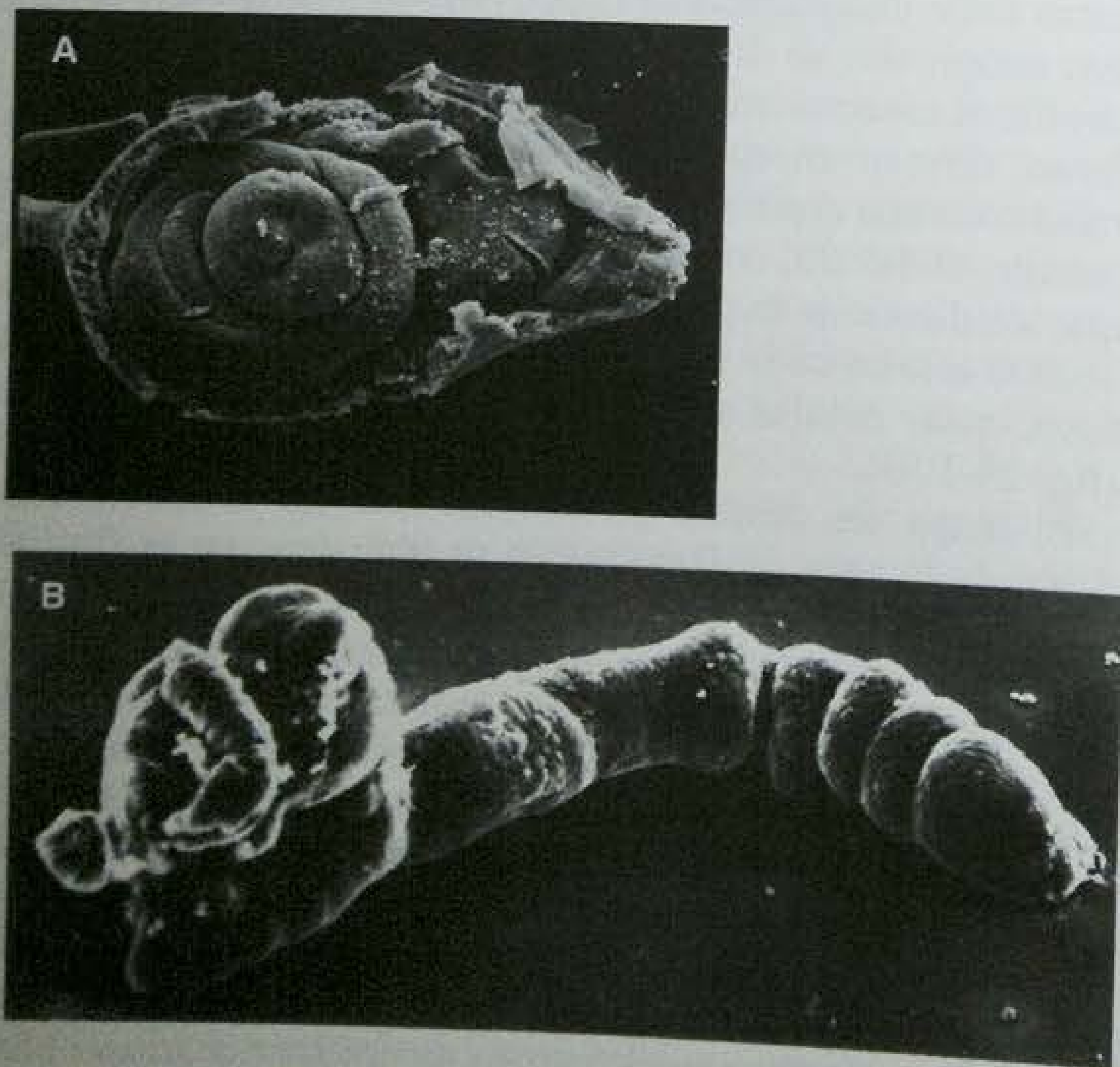


Fig. 18-12. Elongación del disco imaginal. Microfotografía electrónica de barrido del disco de la pata del tercer estadio de *Drosophila*, A, antes y B, después de la elongación. (De Fristrom y col. 1977; microfotografía cortesía de D. Fristrom.)

ESPECIFICACIÓN Y PROLIFERACIÓN. La especificación de los destinos celulares generales (p. ej., que el disco llegue a ser un disco de la pata y no un disco del ala) se produce en el embrión. Los destinos celulares más específicos son especificados en los estadios larvales, a medida que las células proliferan (Kalm y col. 1995). El tipo de estructura de la pata generada está determinado por las interacciones entre varios genes en el disco imaginal. La figura 18-14 muestra la expresión de tres genes involucrados en la determinación del eje proximodistal de la pata de la mosca. En el tercer estadio del disco de la pata, el centro del disco secreta la concentración más alta de los morfógenos Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp). Las concentraciones altas de los factores paracrinos provocan la expresión del gen *Distal-less*. Las concentraciones moderadas causan la expresión del gen *dachshund* y las concentraciones más bajas causan la expresión del gen *homothorax*. Aquellas células que expresan *Distal-less* se telescopan hacia fuera para convertirse en las estructuras más distales de la pata –la garra y los segmentos tarsales distales. Aquellas células que expresan *homothorax* se convierten en la estructura más proximal, la coxa. Las células que están expresando *dachshund* llegan a ser el fémur y la tibia proximal. Las áreas de superposición producen el trocánter y la tibia distal (Abu-Shaar y Mann 1998). Estas regiones de expresión génica son estabilizadas por interacciones inhibitorias entre los productos proteicos de estos genes y de los genes vecinos. De este modo, el gradiente de las proteínas Wg y Dpp se convierte en dominios discretos de expresión génica que especifican las distintas regiones de la pata de *Drosophila*.

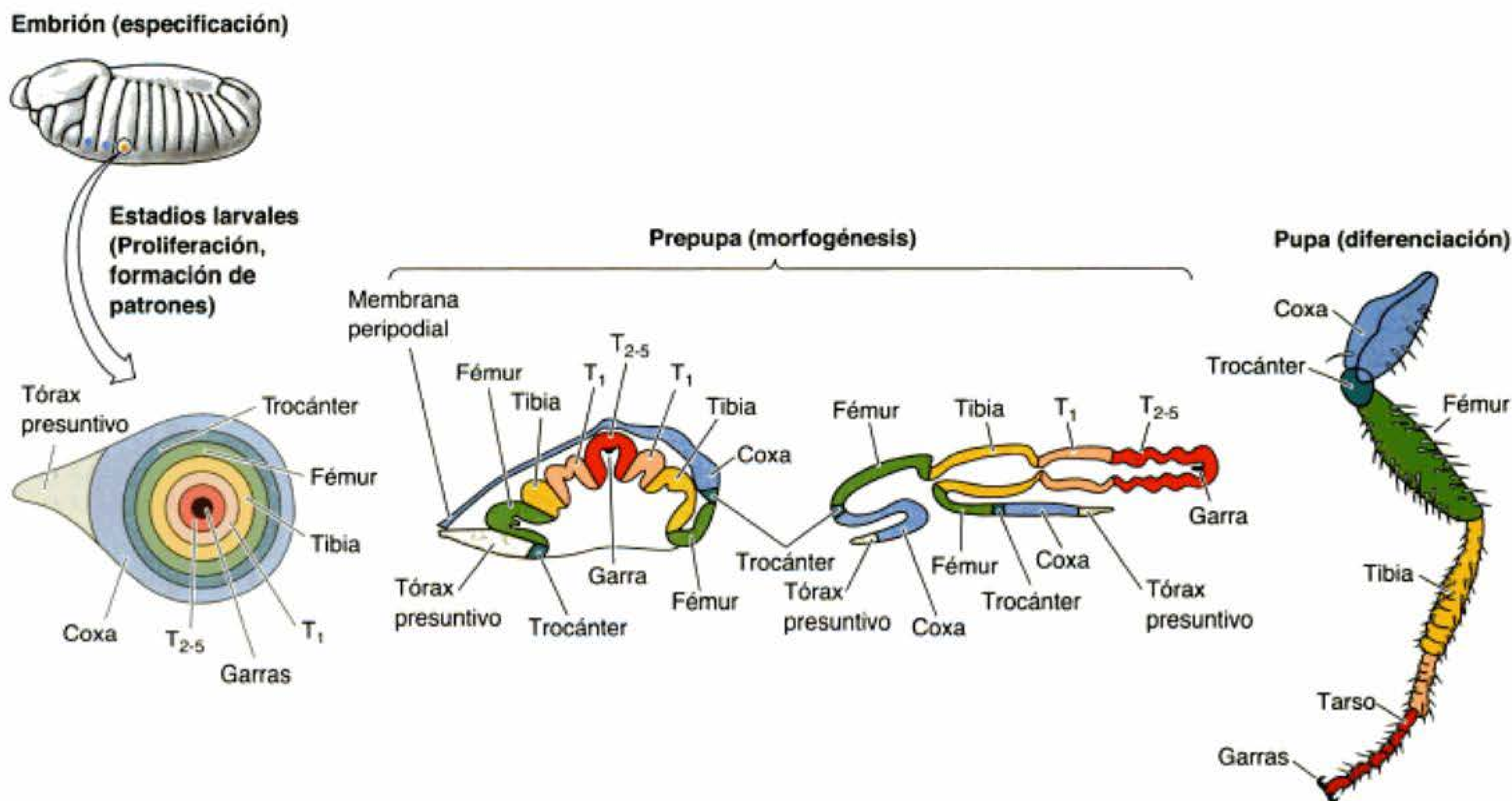


Fig. 18-13. Secuencia del desarrollo del disco imaginal de la pata en *Drosophila*. La especificación del tipo de disco se produce dentro del embrión. La proliferación de las células del disco y la especificación así como el tipo de células de pata que cada uno producirá es llevada a cabo en los estadios larvales. La elongación de los discos tiene lugar en el estadio pupal temprano ("prepupa") y la diferenciación de los tejidos de la pata se produce mientras el insecto es una pupa. T_1, basitarsus; T_{2-5}, segmentos tarsales 2-5. (Según Fristrom y Fristrom 1975; Kalm y col. 1995.)

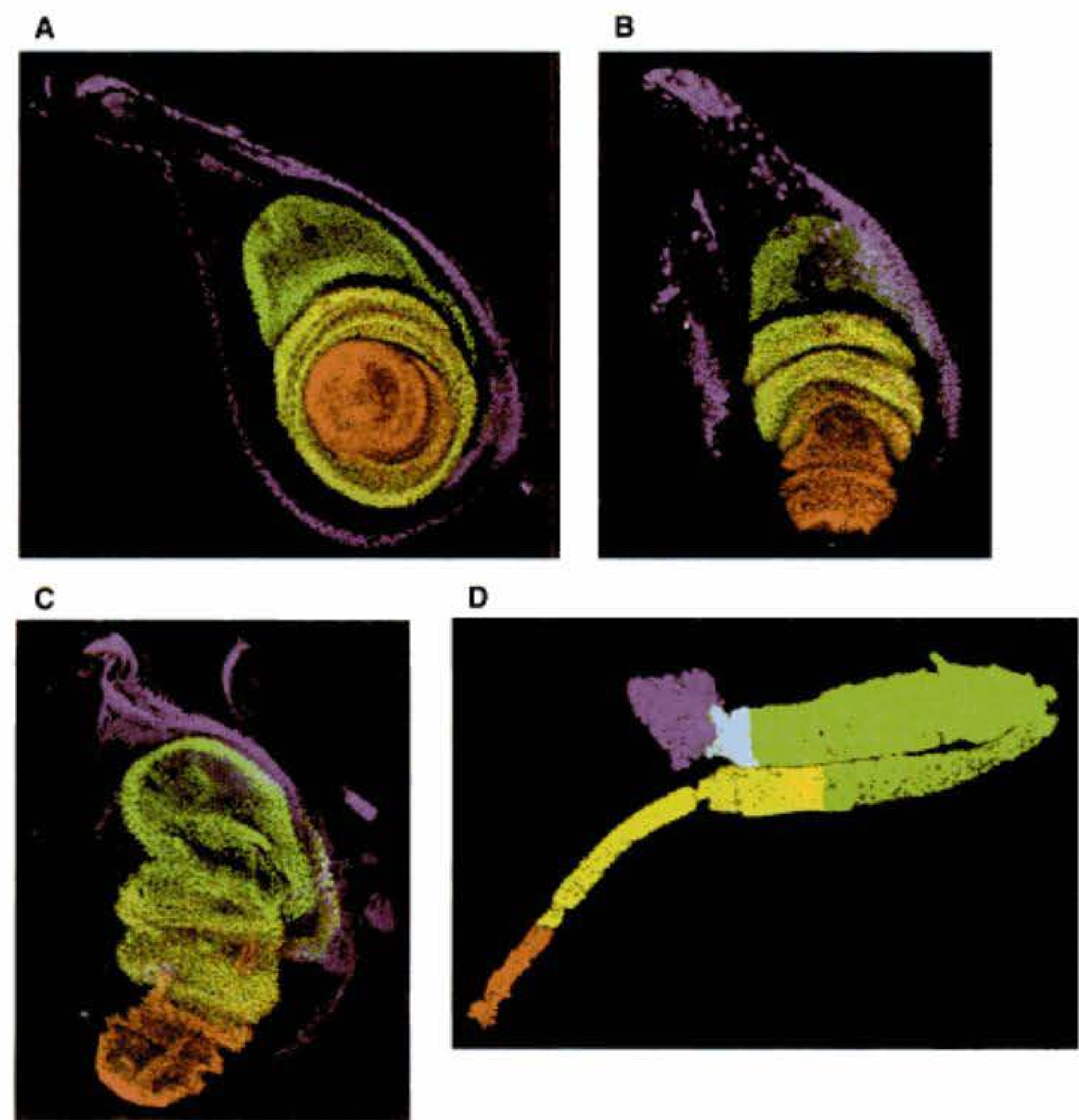


Fig. 18-14. Los destinos de las células del disco imaginal son dirigidos por factores de transcripción hallados en diferentes regiones. **A-D.** Expresión de genes de factores de transcripción en el disco de la pata de *Drosophila*. En la periferia, el gen *homothorax* (violeta) establece el límite para la coxa. La expresión del gen *dachshund* (verde) localiza el fémur y la tibia proximal. Las estructuras más distales, la garra y los segmentos tarsales bajos, se originan a partir del dominio de expresión de *Distal-less* (rojo) en el centro del disco imaginal. La superposición de *dachshund* y *Distal-less* aparece amarilla y especifica la tibia distal y los segmentos tarsales superiores. **A-C.** Expresión génica en estadios de desarrollo sucesivamente más tardíos del desarrollo pupal. **D.** Localización de los dominios de expresión de los genes sobre una pata inmediatamente previa a la eclosión. Las áreas donde está la superposición entre los dominios están en amarillo, azul marino y naranja. (De Abu-Shaar y Mann 1998; microfotografías cortesía de R. S. Mann.)

EVERSIÓN Y DIFERENCIACIÓN. El disco de la pata maduro en el tercer estadio de *Drosophila* no se parece en nada a la estructura del adulto. Éste está determinado, pero todavía no se ha diferenciado. Su diferenciación requiere de una señal hormonal. Esta señal es una serie de pulsos de la hormona **20-hidroxiecdisona (20E)**. El primer pulso, administrado en los estadios larvales tardíos, da comienzo a la formación de la pupa, detiene la división celular en el disco y da comienzo a cambios en la forma celular que conducen la eversión de la pata. Los estudios por Condic y sus colegas en el laboratorio de Fristrom han demostrado que la eversión de la pata del disco imaginal se produce sin división celular y que es debida primariamente a cambios en la forma celular dentro del epitelio del disco (Condic y col. 1990). Con el uso de faloidina marcada fluorescentemente para teñir los microfilamentos periféricos de las células del disco de la pata, demostraron que las células de los discos del tercer estadio temprano están estrechamente dispuestas a lo largo del eje proximal-distal. Luego, cuando es dada la señal hormonal de diferenciación, las células cambian su forma y la pata es evertida, las células centrales del disco llegan a ser las células más distales (garra) de la extremidad. Las estructuras de la pata se diferenciarán dentro de la pupa, de modo tal que en el momento en el que la mosca adulta eclosiona, ellas están completamente formadas y funcionales.

Determinación de los discos imaginales del ala

Los discos imaginales del ala de *Drosophila* se distinguen de los discos imaginales de otras moscas por la expresión del gen *vestigial* (Kim y col. 1996). Cuando este gen es expresado en cualquier otro disco imaginal, surge el tejido del ala.

Los ejes del ala son especificados por los patrones de expresión de genes que dividen al embrión en compartimentos interactuantes diferenciados (fig. 18-15; Meinhart 1980; Caruso y col. 1993; Tabata y col. 1995). En el primer estadio, la expresión del gen *engrailed* distingue el compartimento posterior del ala del compartimento anterior. El factor de transcripción Engrailed activa al gen *hedgehog* en el compartimento posterior, Hedgehog actúa como un factor de transcripción de corto alcance para activar la expresión del gen *decapentaplegic (dpp)* en un estrecho ámbito de células en la región anterior del disco del ala. Dpp actúa como un factor paracrino difusible de largo alcance, estableciendo un gradiente de concentración. Las altas concentraciones de Dpp activan a los genes *spalt* y *oculomotor blind (omb)*, mientras que a bajas concentraciones solo se activa *omb*. Estos genes expresan los factores de transcripción que activan las proteínas que forman las regiones apropiadas del ala.

El eje dorsoventral del ala se forma en el segundo estadio mediante la expresión del gen *apterous* en las células dorsales prospectivas del disco del ala (Blair 1993; Diaz-Benjumea y Cohen 1993). Aquí, la capa más superior del ala se distingue de la capa más inferior de la hoja del ala (véase Bryant 1970; García-Bellido y col. 1973). El gen *vestigial* se mantiene "encendido" en la porción ventral del disco del ala (fig. 18-16). En el límite entre los compartimentos dorsal y ventral, los factores de transcripción Apterous y Vestigial interactúan para activar al gen *wingless*. Neumann y Cohen (1996) demostraron que la proteína Wingless actúa como un factor de crecimiento para promover la proliferación celular que extiende el ala. Wingless también ayuda a establecer el eje proximal-distal del ala: niveles elevados de Wingless activan al gen *Distal-less*, que especifica las regiones más distales del ala (Zecca y col. 1996; Neumann y Cohen 1996).

SITIO WEB 18.1 **La biología molecular de la formación del ala (The molecular biology of wing formation).** La formación del ala de *Drosophila* involucra la interacción de más de 200 genes. Este sitio discute algunas de estas interacciones génicas.

SITIO WEB 18.2 **La especificación homóloga (Homologous specification).** Si un grupo de células en un disco imaginal está mu-

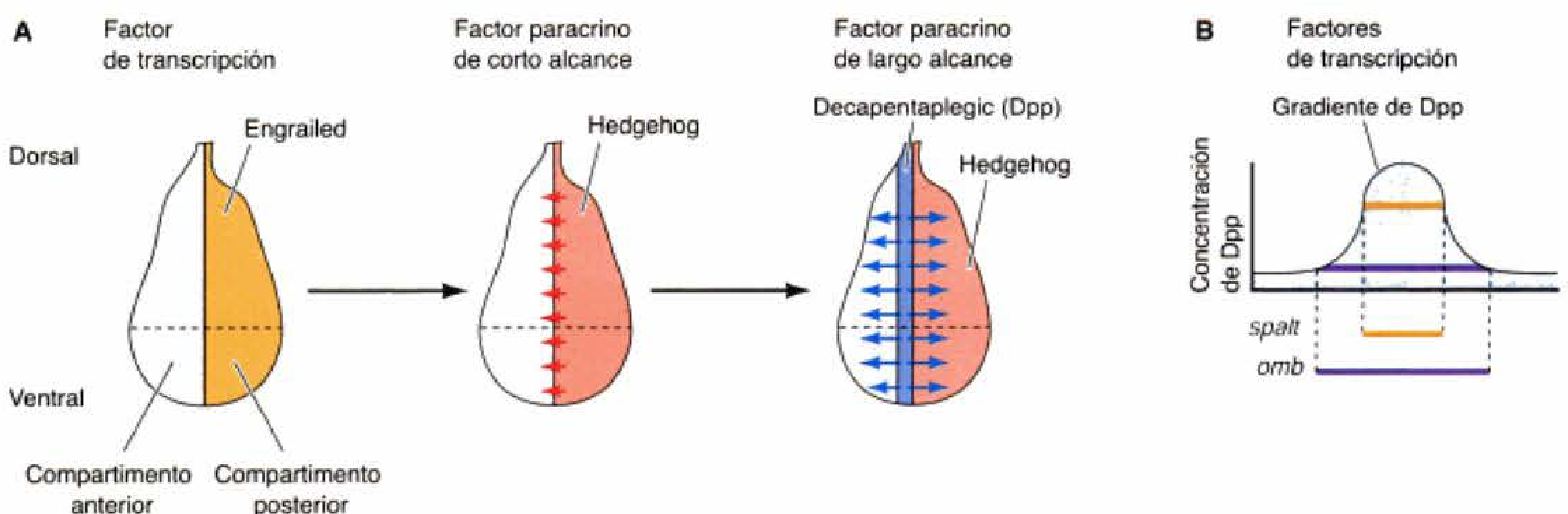


Fig. 18-15. Compartimentalización y establecimiento del patrón anteroposterior en el disco del ala. **A.** En la primera larva instar, se ha formado el eje anteroposterior y se mantiene por la expresión del gen *engrailed* en el compartimento posterior. La proteína Engrailed funciona como un factor de transcripción para activar al gen *hedgehog*. Hedgehog actúa como un factor paracrino de corto alcance para activar al gen *decapentaplegic* en las células anteriores adyacentes al compartimento posterior. La proteína Decapentaplegic (Dpp) actúa como un factor paracrino de largo alcance propagándose desde su fuente en ambas direcciones. **B.** Dpp forma un gradiente de concentración, por medio del cual elevadas concentraciones de Dpp cerca de la fuente activan a los genes *spalt* y *omb*. Concentraciones más bajas (cerca de la periferia) activan a *omb* sin la activación de *spalt*.

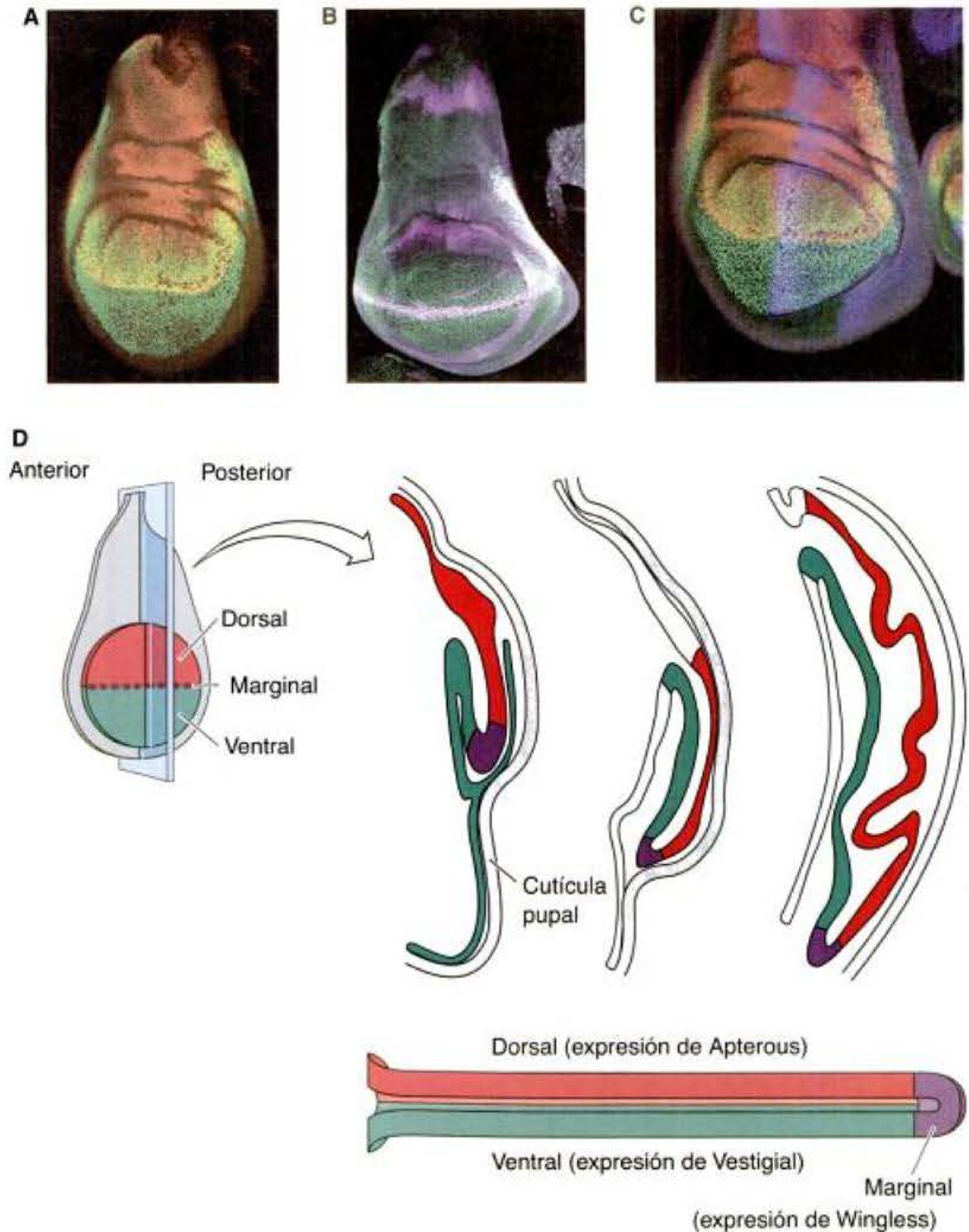


Fig. 18-16. Determinación del eje dorsoventral. **A.** La superficie ventral prospectiva del ala está teñida por anticuerpos contra la proteína Vestigial (verde), mientras que la prospectiva superficie dorsal está teñida por anticuerpos contra la proteína Apterous (rojo). La región de amarillo muestra dónde se superponen estas dos proteínas. **B.** La proteína Wingless (violeta) sintetizada en esta unión organiza el disco del ala a lo largo del eje dorsoventral. La expresión de la proteína Vestigial (verde) se observa en aquellas células próximas a aquellas que expresan Wingless. **C.** Límites anteroposterior y dorsoventral. La proteína Apterous (rojo) se observa en el compartimento dorsal; la proteína Vestigial (verde) se observa en el compartimento ventral. El área amarilla es la superposición. Cubitus interruptus (azul) (inducido por la expresión de Dpp) marca el compartimento anteroposterior como distinto del posterior. **D.** Las porciones dorsal y ventral del disco del ala telescopan hacia afuera para formar el ala de dos capas. Los patrones de expresión están indicados sobre la doble capa del ala. (Fotografía cortesía de S. Carroll y S. Paddock.)

tado de forma tal que ellas dan origen a una estructura característica de otro disco imaginal (por ejemplo, células del disco de la pata que dan origen a las estructuras de la antena), la especificación regional de aquellas estructuras estará en relación con su posición en el disco original.

Control hormonal de la metamorfosis en los insectos

Aunque los mecanismos detallados de la metamorfosis de insectos difieren entre las especies, el patrón general de la acción hormonal es muy semejante. Como en la metamorfosis de anfibios, la metamorfosis de los insectos está regulada por señales hormonales sistémicas, que están controladas por neurohormonas del cerebro (para revisiones, véase Gilbert y Goodman 1981; Riddiford 1996). La muda y la metamorfosis de los insectos está controlada por dos hormonas efectoras: el esteroide **20-hidroxiecdisona** (**20E**) y el lípido **hormona juvenil** (**JH**; del inglés, *juvenile hormone*) (fig. 18-17). 20-hidroxiecdisona da comienzo y coordina cada muda y regula los cambios en la expresión génica que se producen durante la metamorfosis. La hormona juvenil impide los cambios inducidos por la ecdisona en la expresión génica que son necesarios para la metamorfosis. Por lo tanto, su presencia durante la muda asegura que el resultado de la muda es otro estadio larval, no una pupa o un adulto.

El proceso de muda se inicia en el cerebro, donde las células neurosecretoras liberan la **hormona protoracicotrópica** (**PTTH**) en respuesta a señales neurales, hormonales o ambientales. PTTH es un péptido hormonal con un peso molecular de aproximadamente 40.000 y estimula la producción de ecdisona por la **glándula protorácica**. La ecdisona es modificada en los tejidos periféricos para convertirse en la hormona 20E activa de la muda. Cada muda es iniciada por uno o más pulsos de 20E. Para una muda larval, el primer pulso produce un pequeño aumento en la concentración de 20E en la hemolinfa larval (sangre) y provoca un cambio en el compromiso celular en la epidermis. Un segundo pulso más largo de 20E da comienzo a los acontecimientos de diferenciación asociados con la muda. Estos pulsos de 20E comprome-

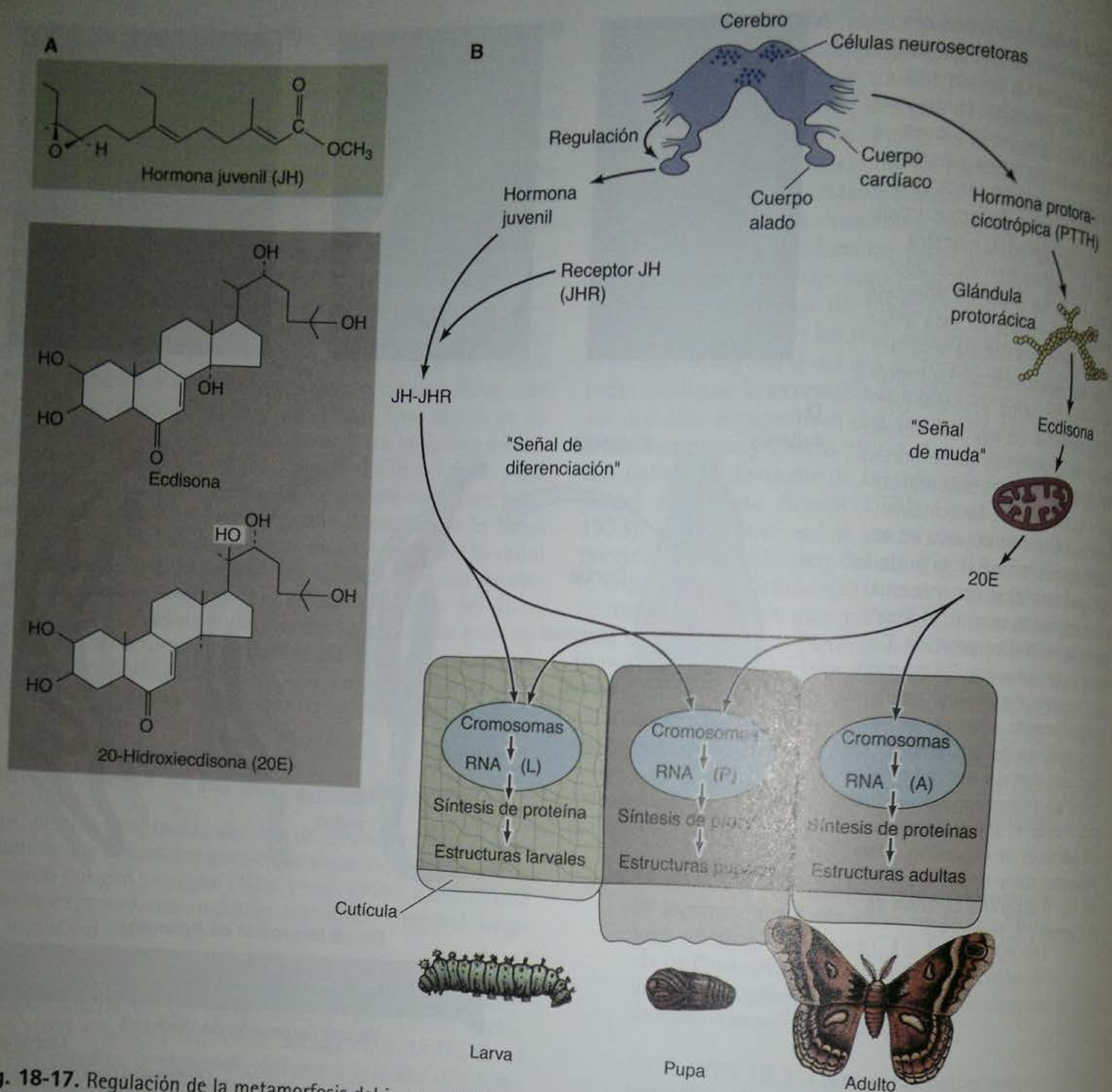


Fig. 18-17. Regulación de la metamorfosis del insecto. **A.** Estructuras de la hormona juvenil, ecdisona y la hormona de activación de la muda 20-hidroxiecdisona. **B.** Camino general de la metamorfosis del insecto. La ecdisona y la hormona juvenil juntas causan la muda que forma otro estadio larval. Cuando hay una baja concentración de hormona juvenil, la muda inducida por ecdisona produce una pupa. Cuando la ecdisona actúa ante la ausencia de hormona juvenil, los discos imaginales se diferencian y la muda da origen a un adulto. (Según Gilbert y Goodman 1981.)

ten y estimulan a las células epidérmicas a sintetizar enzimas que digieren y reciclan los componentes de la cutícula.

La hormona juvenil es secretada por el **cuerpo alado**. Las células secretoras del cuerpo alado son activas durante las mudas larvales pero son inactivas durante la muda metamórfica. Cuando la hormona juvenil está presente, las mudas estimuladas por 20E resultan en una nueva larva instar. Sin embargo, en el último estadio larval, el nervio medial desde el cerebro hacia el cuerpo alado inhibe la producción de hormona juvenil por parte de estas glándulas y hay un aumento simultáneo en la capacidad del cuerpo para degradar hormona juvenil existente (Safranek y Williams 1989). Ambos mecanismos hacen que los niveles de hormona juvenil desciendan por debajo de un valor umbral crítico. Esto desencadena la liberación de PTTH desde el cerebro (Nijhout y Williams 1974; Rountree y Bollenbacher 1986). PTTH, a su vez, estimula a las glándulas protorácicas a secretar una pequeña cantidad de ecdisona. La 20E resultante, ante la ausencia de altos niveles de hormona juvenil, compromete a las células epidérmicas hacia el desarrollo pupal. Los mRNA específicos de la larva no son reemplazados y son sintetizados nuevos mRNA cuyos productos proteicos inhiben la transcripción de los mensajeros larvales.

Después de un segundo pulso de ecdisona, se sintetizan nuevos productos génicos específicos de la pupa (Riddiford 1982), y la muda subsiguiente cambia el organismo desde larva a pupa. Es aparente, entonces, que el primer pulso de ecdisona durante el último estadio larval desencadena el proceso que inactiva a genes específicos de larva y prepara a genes específicos de pupa a ser transcritos. El segundo pulso de ecdisona transcribe a genes específicos de la pupa y da comienzo a la muda (Nijhout 1994).

En la muda imaginal, cuando la ecdisona actúa ante la ausencia de hormona juvenil, los discos imaginales se diferencian y la muda da origen a un adulto.

> SITIO WEB 18.3 **Metamorfosis de insectos (Insect metamorphosis).** Cuatro sitios web tratan sobre 1) los experimentos de Wigglesworth y otros, quienes identificaron las hormonas de la metamorfosis y las glándulas que las producen; 2) las variaciones que juegan *Drosophila* y otros insectos sobre el tema general de la metamorfosis; 3) la remodelación del sistema nervioso del insecto durante la metamorfosis, y 4) un análisis de micromatriz de la metamorfosis de *Drosophila* por medio del cual varios miles de genes fueron analizados simultáneamente.

Biología molecular de la actividad de la 20-hidroxiecdisona

RECEPTORES DE ECDISONA. La 20-hidroxiecdisona no puede unirse al DNA por sí misma. Como las hormonas tiroideas de anfibios, la 20E primero se une a receptores nucleares. Estas proteínas, denominadas receptores de ecdisona (EcR), son casi idénticos en estructura a los receptores de hormonas tiroideas de anfibios. Una proteína EcR forma una molécula activa al acoplarse con una proteína Ultraspiracle (Usp), el homólogo del anfibio RXR que ayuda a formar el receptor de hormona tiroidea activo (Koelle y col. 1991; Yao y col. 1992; Thomas y col. 1993). Ante la ausencia de EcR unido a la hormona, la proteína Usp se une a los genes que responden a ecdisona e inhibe su transcripción.* Esta inhibición es convertida en activación cuando el receptor de ecdisona se une a la Usp (Schubiger y Truman 2000).

Aunque hay solo un gen para el EcR, el transcrito de mRNA de EcR puede ser empalmado en al menos tres modos diferentes para formar tres proteínas distintas. Las tres proteínas del EcR tienen los mismos dominios para la unión de 20E y del DNA, pero difieren en sus domimios aminoterminales. El tipo de EcR en una célula puede informarle cómo actuar cuando ésta reciba una señal hormonal (Talbot y col. 1993; Truman y col. 1994). Todas las células parecen tener algunos EcR de cada tipo, pero los tejidos estrictamente larvales y las neuronas que mueren cuando son expuestas a 20E están caracterizadas por su abundancia de la isoforma del receptor de ecdisona EcR-B1. Los discos imaginales y las neuronas en diferenciación, por otra parte, muestran una preponderancia de la isoforma EcR-A. Por esta razón, es posible que los diferentes receptores activen a diferentes series de genes cuando ellos se unen a la 20E.

UNIÓN DE LA 20-HIDROXIECDISONA AL DNA. Durante la muda y la metamorfosis, ciertas regiones de los cromosomas politénicos de *Drosophila* forman protuberancias (puffs) en las células de ciertos órganos a determinados tiempos (véase fig. 4-12; Clever 1966; Ashburner 1972; Ashburner y Berondes 1978). Estas protuberancias cromosómicas representan áreas donde el DNA está siendo transcrito activamente. Además, estos patrones de las protuberancias cromosómicas específicos de órgano pueden ser reproducidos mediante el cultivo de tejido larval y el agregado de hormonas al medio o mediante el agregado de 20E a un estadio temprano de larva. Cuando 20E es agregado a una glándula salival de larva, se producen ciertas protuberancias y otras experimentan regresión (fig. 18-18). La formación de estas protuberancias está mediada por la unión de 20E a lugares específicos sobre los cromosomas; los anticuerpos fluorescentes contra 20E encuentran a esta hormona localizada en las regiones del genoma que son sensibles a ésta (Gronemeyer y Pongs 1980).

Las protuberancias cromosómicas reguladas por 20E que se producen durante los estadios tardíos del tercer estadio larval de *Drosophila* (cuando ésta se prepara para formar la pupa) pueden dividirse en tres categorías: protuberancias "tempranas" que 20E induce rápidamente; protuberancias "intermudas" que 20E hace que experimenten regresión y protuberancias "tardías" que son vistas primero varias horas después de la estimulación con 20E. Por ejemplo, en la glándula salival larval, cerca de

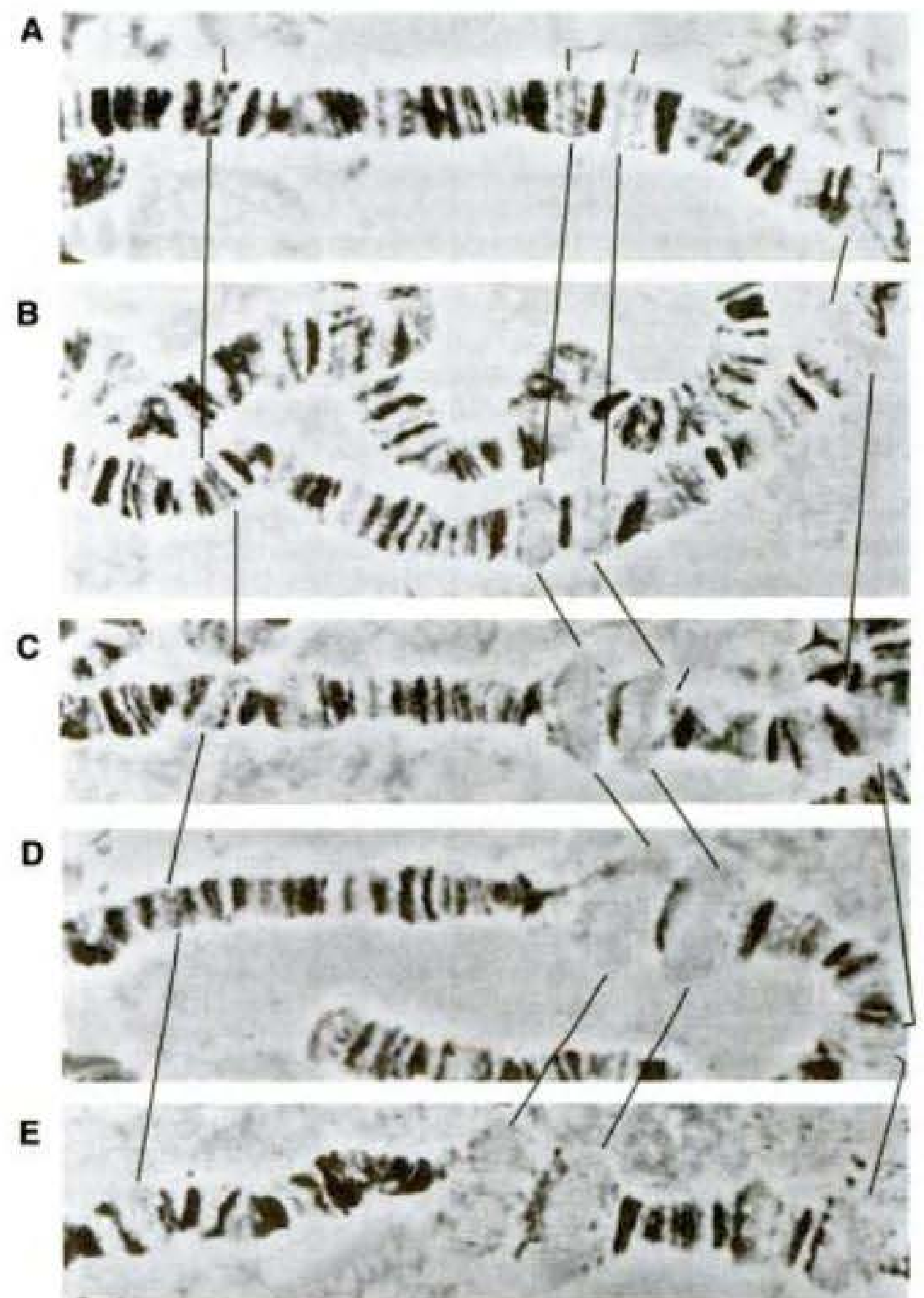


Fig. 18-18. Protuberancias (puffs) inducidas por 20-E en las células de la glándula salival cultivadas de *D. melanogaster*. La región cromosómica aquí es la misma como en la figura 4-12. **A.** Control sin inducir. **B–E.** Cromosomas estimulados con 20-E a los **B**, 25 minutos, **C**, 1 hora, **D**, 2 horas y **E**, 4 horas. (Microfotografías cortesía de M. Ashburner.)

* La proteína Ultraspiracle puede ser el receptor para la hormona juvenil (JHR; véase fig. 18-17), sugiriendo de este modo mecanismos por los cuales JH puede bloquear a 20E a nivel de la transcripción (Jones y col. 2001).

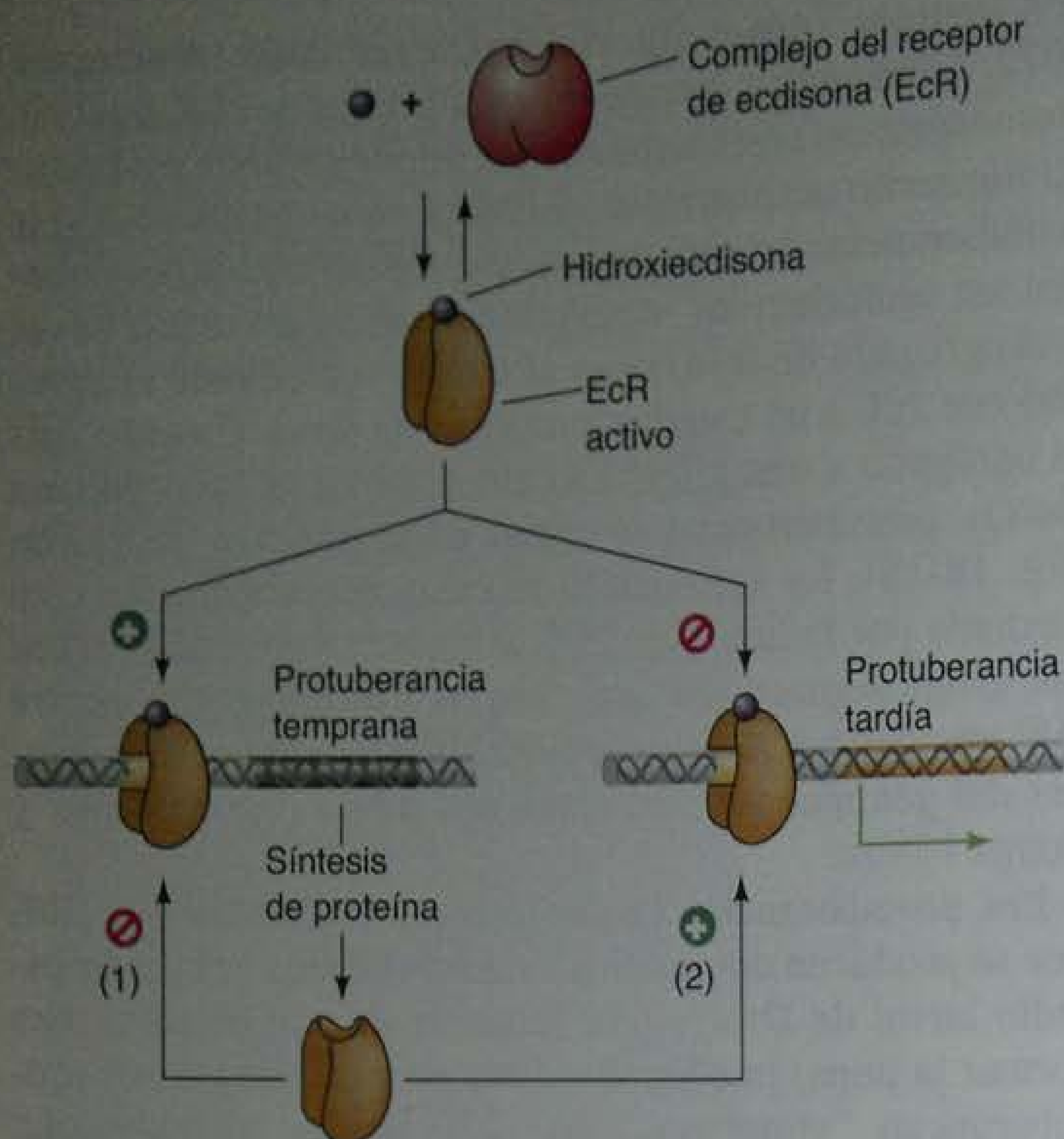


Fig. 18-19. Modelo de regulación de la transcripción de hidroxiecdisona de Ashburner. 20E se une a su receptor y el compuesto resultante se une a un gen de protuberancia temprana y a un gen de protuberancia tardía. El gen de protuberancia temprana es activado y su producto proteico (1) reprime la transcripción de su propio gen y (2) activa al gen de protuberancia tardía, quizá mediante el desplazamiento del receptor de ecdisona. (Según Richards 1992.)

seis protuberancias surgen a los pocos minutos del tratamiento con hidroxiecdisona. No tienen que ser sintetizadas nuevas proteínas para que estas protuberancias tempranas sean inducidas. Una serie más grande de protuberancias es inducida tardíamente en el desarrollo y estas protuberancias tardías no necesitan síntesis de proteínas para llegar a ser transcritas. Ashburner (1974, 1990) postuló la hipótesis de que los genes de "protuberancia temprana" elaboran un producto proteico que es esencial para la activación de los genes de la "protuberancia tardía" y que, además, esta proteína reguladora temprana autoapaga la transcripción de los genes tempranos* (fig. 18-19). Estas consideraciones han sido confirmadas por análisis moleculares.

VADE MECUM[2] **Cromosoma aplastado (Chromosome squash)**. Cómo hacer un cromosoma aplastado utilizando la glándula salival de *Drosophila*.
[**Hacer clic sobre Fruit Fly**]

Las protuberancias tempranas incluyen los genes para dos factores de transcripción importantes, el complejo amplio y E74B. Igual que el gen receptor de ecdisona, el gen del **complejo amplio** (***Broad-Complex***) (**BR-C**) puede generar varias proteínas factores de transcripción distintas mediante los mensajeros iniciados y empalmados diferencialmente. Parece que las variantes del receptor de ecdisona pueden inducir la síntesis de variantes particulares de la proteína BR-C. Los órganos tales como las glándulas salivales larvales que están destinadas a morir durante la metamorfosis expresan la isoforma Z1; los discos imaginales destinados a la diferenciación expresan la isoforma Z2 y el sistema nervioso central (que experimenta una remodelación marcada durante la metamorfosis) expresa todas las isoformas, con el predominio de Z3 (Emery y col. 1994; Crossgrove y col. 1996).

Además de las actividades restringidas a las diferentes isoformas de BR-C, parece haber procesos comunes que llevan a cabo todas las isoformas. Restifo y Wilson (1998) proporcionaron evidencia de que estas funciones comunes son impedidas por la hormona juvenil. Las supresiones del gen BR-C conducen a un desarrollo muscular defectuoso, la conservación de las estructuras larvales que normalmente deberían degenerar, una morfología anormal del sistema nervioso y finalmente la muerte de la larva (Restifo y White 1991). Este síndrome es muy semejante al inducido por el agregado de exceso de hormona juvenil a la larva del gusano de seda *Cecropia* (Riddiford 1972) o mediante el agregado de hormona juvenil análoga a la larva de *Drosophila*. Por lo tanto, parece que la hormona juvenil impide la expresión génica inducible por ecdisona al interferir con las proteínas BR-C. Las proteínas BR-C y E74 son factores de transcripción y sus blancos se están identificando. Estas proteínas pueden unirse al promotor del gen de la protuberancia tardía y regular directamente su transcripción (Urness y Thummel 1995; Crossgrove y col. 1996).

LA MUERTE DE LOS TEJIDOS LARVALES. La muerte celular larval en *Drosophila* es conducida por inducciones específica de estadio y específica de tejido de dos genes de la "muerte," *reaper* y *head involution defective* (*hid*). Estos dos genes son inducidos de forma coordinada por 20E. Estudios genéticos sobre la glándula salival larval han demostrado que se requieren BR-C y E74 para la muerte celular glandular en la metamorfosis. 20E induce a BR-C y E74, y ésta ayuda a transcribir el gen *reaper*. La proteína BR-C se requiere para transcribir a los genes *hid* y *reaper* y E74 es requerida para los máximos niveles de expresión de *hid* (Jiang y col. 2000).

COORDINACIÓN DEL RECEPTOR Y EL LIGANDO. Como la historia de la metamorfosis de anfibios, las historias de la metamorfosis de insectos involucran complejas interacciones entre ligandos y receptores. Los "tejidos blanco" no son simplemente receptores pasivos de la señal hormonal. En su lugar, se vuelven sensibles a las hormonas únicamente en momentos particulares. Por ejemplo, cuando hay un pulso de ecdisona en el medio del cuarto instar del gusano del cuerno del tabaco polillero *Manduca*, la epidermis es capaz de responder a ésta, debido a que está expresando los receptores de ecdisona. Sin embargo, los discos del ala no responden, debido a que ellos no sintetizan sus receptores de ecdisona hasta el estadio

* Desde este descubrimiento en 1954, cuando Butenandt y Karlson aislaron 25 mg de ecdisona desde 500 kg de pupas de polillas del gusano de seda, 20-hidroxiecdisona ha estado bajo varios nombres, incluyendo ecdisterona, β-ecdisona y crustecdisona. La observación que 20E controlaba las unidades de transcripción de los cromosomas fue un descubrimiento extremadamente importante y excitante. Esa fue la primera visión real de la regulación génica en organismos eucarióticos. En este momento cuando se hizo este descubrimiento, los únicos ejemplos de regulación génica transcripcional eran de bacterias.

prepupal. Por lo tanto, los discos del ala no están afectados por ecdisona hasta el estadio prepupal, momento en el cual sintetizan los receptores de ecdisona. Luego, comienzan a crecer y a diferenciarse (Nijhout 1999).

SITIO WEB 18.4 **Precocenes y JH sintética (Precocenes and synthetic JH).** Debido a la voracidad de la larva del insecto, es asombroso que existan las plantas. Sin embargo, muchas plantas se toman venganza sobre sus depredadores al producir componentes que alteran sus metamorfosis e impiden que los animales se desarrollen o reproduzcan.

Regeneración

La regeneración –la reactivación del desarrollo en la vida postembrionaria para restablecer tejidos perdidos– es tan "inhumano" que ha sido la fuente de fascinación para los humanos desde los comienzos de la ciencia biológica. Es difícil contemplar el fenómeno de la regeneración de la extremidad en tritones o estrellas de mar sin preguntarse por qué nosotros no podemos regenerar nuestros propios brazos y piernas. ¿Qué les da a las salamandras esta capacidad de la que nosotros carecemos profundamente? La biología experimental nació en el esfuerzo de los naturalistas del siglo XVIII para documentar la regeneración y para responder esta pregunta. Los experimentos de regeneración de Tremblay (hidra), Réaumur (crustáceos) y de Spallanzani (salamandras) establecieron el estándar para la investigación experimental y para la discusión inteligente de estos datos (véase Dinsmore 1991). Réaumur, por ejemplo, sostenía que el cangrejo de río tenía la capacidad de regenerar sus extremidades debido a que sus extremidades se rompen fácilmente en las articulaciones.* Las extremidades humanas, él escribió, no son tan vulnerables, de modo tal que la naturaleza no nos proporcionó con extremidades regenerables, pero con "una hermosa oportunidad para admirar su previsión." El consejo de Tremblay a los investigadores que debían entrar a este nuevo campo aún hoy es apropiado. Él nos decía de ir directamente a la naturaleza y de evitar los prejuicios que nos daba nuestra educación.† Además, "uno no debería llegar a desanimarse por la necesidad de éxito, sino que debería intentar nuevamente sin importar haber fallado. Es incluso bueno repetir experimentos exitosos un número de veces. Todo lo que es posible ver no es descubierto y con frecuencia no será descubierto la primera vez."

Más de dos siglos más tarde, comenzamos a hallar las respuestas a los grandes problemas de la regeneración, y muy pronto podremos ser capaces de alterar el cuerpo humano de modo tal que le permita regenerar a nuestras propias extremidades, nervios y órganos. Esto significa que extremidades cortadas podrían ser restablecidas, que órganos enfermos podrían ser extirpados y recultivados, y que las células nerviosas alteradas por la edad, enfermedad o trauma podrían volver a funcionar normalmente. Para traer estos tratamientos a la humanidad, primero tenemos que entender cómo se produce la regeneración en las especies que tienen esta capacidad. Nuestro nuevo conocimiento de los papeles de los factores paracrinos en la formación de órganos y nuestra capacidad para clonar los genes que producen aquellos factores, han impulsado lo que Susan Bryant (1999) ha denominado "un renacimiento de la regeneración." Debido a que "renacimiento" significa literalmente "volver a nacer" y debido a que la regeneración puede ser vista como un retorno al estado embrionario, el término es apto en muchos sentidos.

Hay tres modos principales por medio de los cuales se puede producir la regeneración. El primer mecanismo involucra la desdiferenciación de las estructuras adultas para formar una masa indiferenciada de células que luego llegan a ser reespecificadas. Este tipo de regeneración es denominada **epimorfosis** y es característica de las extremidades en regeneración. El segundo mecanismo es denominado **morfalaxis.** Aquí, la regeneración se produce a través del restablecimiento del patrón de tejidos existentes y hay poco crecimiento nuevo. Tal regeneración se observa en hidra. Un tercer, intermedio, tipo de regeneración puede ser pensada como una **regeneración compensatoria**. Aquí, las células se dividen, pero mantienen sus funciones diferenciadas. Ellas producen células semejantes a ellas mismas y no forman una masa de tejido indiferenciado. Este tipo de regeneración es característico del hígado de mamíferos. Se discutió tempranamente en este libro la regeneración de los gusanos planos (capítulo 3). Aquí se concentrará sobre la regeneración de la extremidad de la salamandra, de la hidra y del hígado de mamíferos.

Regeneración epimórfica de las extremidades de la salamandra

Cuando una extremidad de salamandra de adulto es amputada, las células que quedan son capaces de reconstruir una extremidad completa, con todas sus células diferenciadas organizadas en un orden apropiado. En otras palabras, las nuevas células construyen solo las estructuras ausentes y no más. Por ejemplo, cuando se amputa una muñeca, la salamandra forma una nueva muñeca y no un nuevo codo (fig. 18-20). De algún modo, la extremidad de la salamandra "conoce" dónde ha sido dañado el eje proximal-distal y es capaz de regenerarse desde este punto en adelante. Las salamandras llevan a cabo esta proeza mediante desdiferenciación, proliferación y reespecificación celular (véanse Brockes y Kumar 2002; Gardiner y col. 2002). Este tipo de regeneración se denomina epimorfosis.

* La relación entre adaptación y regeneración fue confirmada en el fenómeno de regeneración del Wolff del cristalino de la salamandra (véase sitio web 4.4). Los nuevos intentos de regenerar el hueso coxal humano y el tejido neural son discutidos en el capítulo 21.

† La tradición de dejar los libros y las aulas e ir directamente a la naturaleza es muy fuerte en la biología del desarrollo. Hay un letrero en el laboratorio de biología marina de Woods Hole, escena de alguna de las investigaciones embriológicas más importantes en América. El letrero, atribuido a Louis Agassiz dice: "Estudia la naturaleza, no los libros." Éste cuelga a la entrada de la biblioteca.

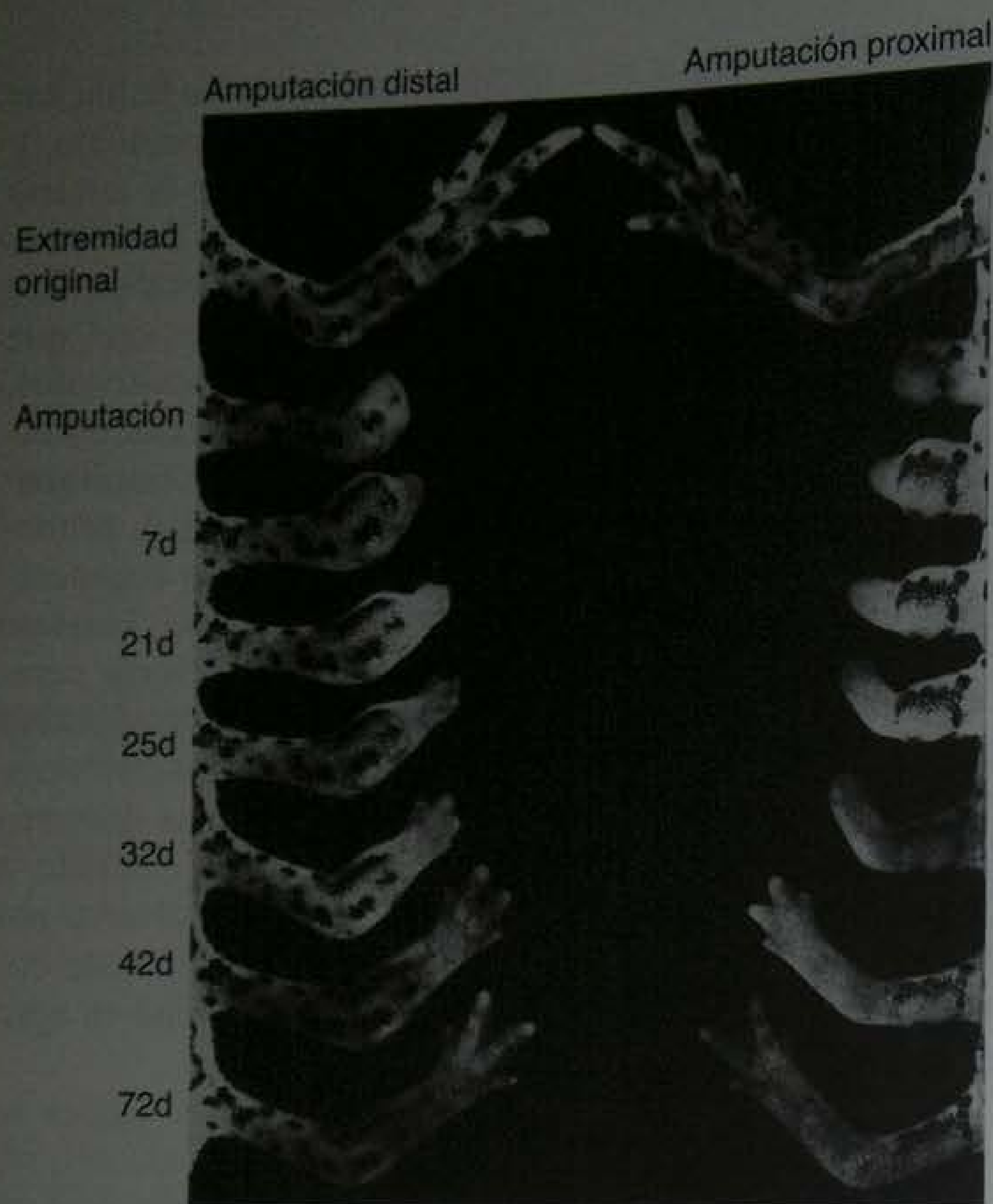


Fig. 18-20. Regeneración de la extremidad anterior de la salamandra. La amputación que se muestra sobre la izquierda fue hecha por debajo del codo; la amputación que se muestra sobre la derecha corta a través del húmero. En ambos ejemplos, la información posicional correcta es reespecificada y se regenera una extremidad normal. (De Goss 1969; fotografía cortesía de R. J. Goss.)

Formación del capuchón apical ectodérmico y regeneración del blastema

Sobre la extremidad amputada, se forma un coágulo de plasma, y dentro de las 6 a 12 horas, las células epidérmicas del muñón remanente migran para cubrir la superficie herida, formando la **herida de la epidermis**. Esta estructura de una sola capa es requerida para la regeneración de la extremidad, y prolifera para formar el **capuchón apical ectodérmico**. Por lo tanto, en contraste con la curación de las heridas en mamíferos, no se forma cicatriz y la dermis no se mueve con la epidermis para cubrir el sitio de amputación. Los nervios que inervan la extremidad degeneran por una distancia corta cercana al plano de amputación (véase Chernoff y Stocum 1995).

Durante los siguientes cuatro días, las células por debajo del capuchón en desarrollo experimentan una drástica desdiferenciación: células óseas, células cartilaginosas, fibroblastos, miocitos y células neurales pierden sus características diferenciadas y se separan entre sí. Los genes que son expresados en tejidos diferenciados (tales como los genes *mrf4* y *myf5* expresados en las células musculares) son regulados en menos, mientras que hay un drástico incremento en la expresión de genes tales como *msx1*, que están asociados con el mesénquima de la zona de progreso en proliferación de la extremidad embrionaria (Simon y col. 1995). La región de la extremidad anteriormente bien estructurada en el borde cortado del muñón, por lo tanto, forma una masa en proliferación de células indistinguibles, desdiferenciadas justo por debajo del capuchón apical ectodérmico. Esta masa de células desdiferenciadas se denomina **blastema de regeneración**. Estas células continuarán proliferando y finalmente se rediferenciarán para formar las nuevas estructuras de la extremidad (fig. 18-21; Butler 1935).

La creación del blastema de regeneración depende de la formación de células mononucleadas individuales. Es probable que los macrófagos liberados hacia el sitio de la herida secreten metaloproteinasas que digieren las matrices extracelulares manteniendo juntas a las células epiteliales (Yang y col. 1999). Pero muchas de estas células están diferenciadas y han dejado el ciclo celular. ¿Cómo hacen ellas para recuperar la capacidad para dividirse? Los estudios de microscopía y de colorantes trazadores han demostrado que cuando miotubos multinucleados (cuyos núcleos han sido sacados del ciclo celular: véase capítulo 14) son introducidos en un blastema, dan origen a células mononucleadas marcadas que proliferan y pueden diferenciarse en muchos tejidos de la extremidad en regeneración (Hay 1959; Lo y col. 1993). Parece que los núcleos de los miotubos son forzados a reingresar al ciclo celular por un factor del suero creado por trombina, la misma proteasa que está involucrada en la formación de los coágulos. La trombina es liberada cuando se produce la amputación, y cuando el suero es expuesto a la trombina, ésta forma un factor capaz de inducir a los miotubos de tritón en cultivos a ingresar al ciclo celular. Sin embargo, los miotubos de ratón, no responden a esta proteína, aunque ellos se desdiferenciarán en respuesta a un extracto de blastemas de tritón en regeneración. Esta diferencia en la respuesta puede relacionarse directamente con la diferencia en la capacidad regenerativa entre salamandras y los mamíferos* (Tanaka y col. 1999; McGann y col. 2001). La generación de un blastema de regeneración también puede depender del mantenimiento de corrientes iónicas conducidas a través del muñón; si se suprime el campo eléctrico, no se produce la regeneración del blastema (Altizer y col. 2002).

Proliferación de las células del blastema: el requerimiento de nervios

La proliferación del blastema de regeneración depende de la presencia de nervios. Singer (1954) demostró que debe estar presente un mínimo número de fibras nerviosas para que la regeneración tenga lugar. Se piensa que

---

* Este factor producido por la trombina todavía no ha sido aislado. Pero ésta no es la única diferencia entre las extremidades de los urodelos y de los mamíferos. Otra diferencia es que las salamandras conservan la expresión de genes Hox en sus apéndices incluso cuando son adultas. Debe observarse que, aunque la mayor parte del blastema de regeneración viene de la desdiferenciación del tejido en el borde del muñón, otra fuente de células también es posible. Mientras que el tejido muscular esquelético multinucleado se desdiferenciará y aportará células mononucleadas no comprometidas al blastema, la extremidad también contiene células musculares satélites –células mononucleadas comprometidas al linaje muscular– que pueden ser utilizadas durante la regeneración. Por lo tanto, el músculo de las extremidades regeneradas puede venir desde el blastema y desde las células de reserva (Dedkov y col. 2001;

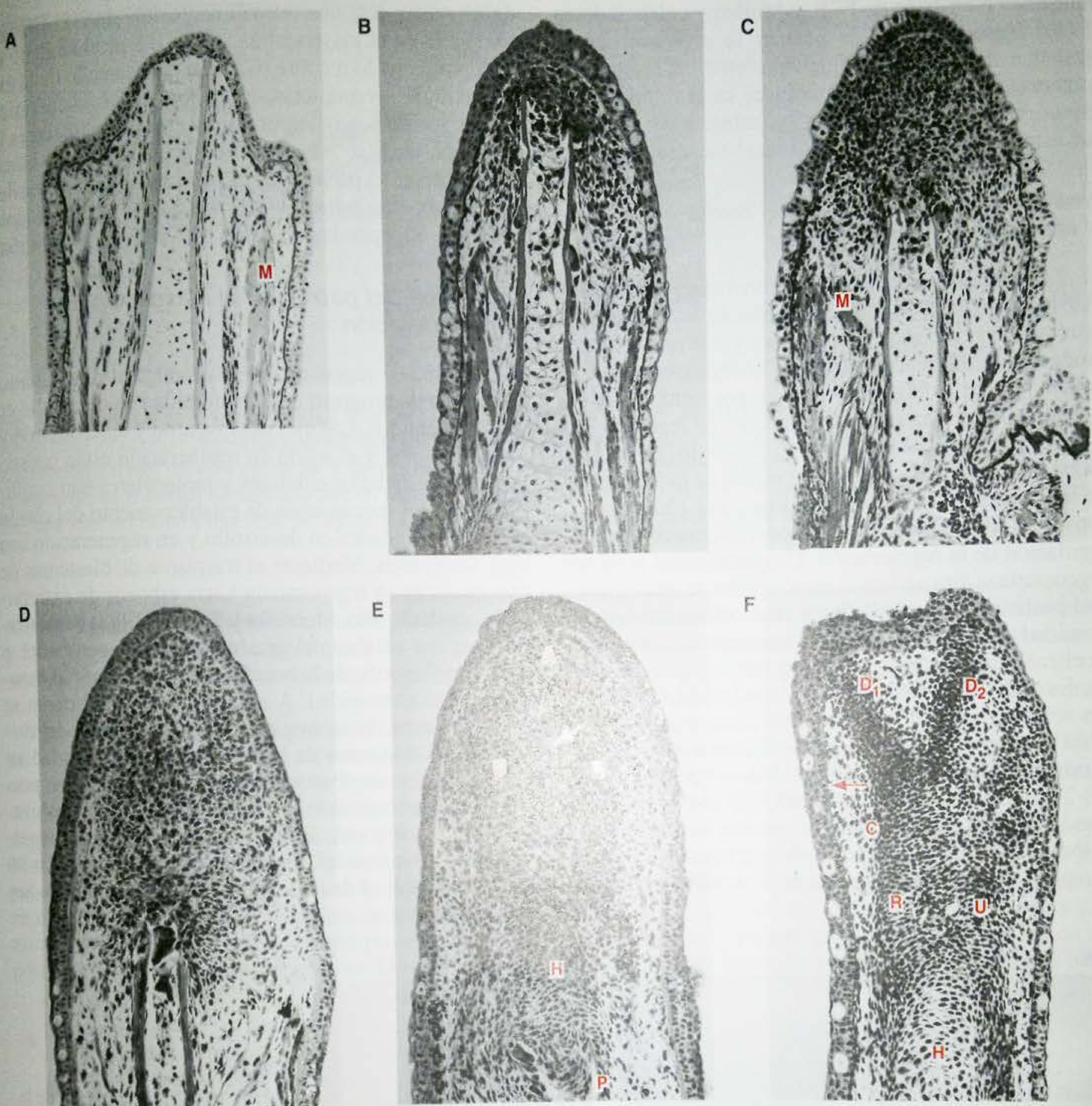


Fig. 18-21. Regeneración en la extremidad anterior de la larva de salamandra manchada *Ambystoma maculatum*. **A.** Sección longitudinal de la extremidad superior, 2 días después de la amputación. La piel y el músculo se han retraído del extremo del húmero. **B.** A los 5 días de la amputación, se observa una delgada acumulación de células del blastema por debajo de una epidermis engrosada. **C.** A los 7 días, una población más grande de células mitóticamente activas del blastema se localiza en el extremo distal del húmero. **D.** A los 8 días, el blastema se alarga por actividad mitótica; se ha producido la mayor parte de la diferenciación. **E.** A los 9 días, se puede ver la rediferenciación temprana. La condrogénesis ha comenzado en la parte proximal del húmero en regeneración, H. La letra A marca el mesénquima apical del blastema, y U y R son las condensaciones precartilaginosas que formarán el cúbito y el radio, respectivamente. P representa el muñón donde fue hecha la amputación. **F.** A los 10 días de la amputación, también pueden verse las condensaciones precartilaginosas para los huesos carpales (tobillo, C), y los dos primeros dígitos (D_1, D_2). (De Stocum 1979; microfotografías cortesía de D. L. Stocum.)

las neuronas liberan factores que incrementan la proliferación de las células del blastema (Singer y Caston 1972; Mescher y Tassava 1975). Uno de estos factores, el **factor de crecimiento glial**, parece ser necesario para mantener un alto grado de proliferación en las células del blastema (Brockes y Kinter 1986; Wang y col. 2000). El **factor de crecimiento fibroblástico 2** (FGF2), otro factor encontrado en los axones que inervan la extremidad del anfibio, también parece ser crítico en este proceso. FGF2 puede jugar más que un papel en la regeneración. En primer lugar, puede servir como un factor de angiogénesis, debido a que el tejido en regeneración necesita y desarrolla un suministro sanguíneo muy poco tiempo después de la amputación (Rageh y col. 2002). En segundo lugar, éste podría actuar para estimular la mitosis y para establecer el patrón de la extremidad en regeneración. Mescher y Gospodarowicz (1979) pudieron restablecer la mitosis a blastemas desnervados mediante la ad-

ministración en éstos de FGF, y Mullen y colaboradores (1996) fueron capaces de obtener la regeneración de blastemas desnervados al implantar en ellos bolitas que contenían FGF2. El FGF2 restablece en el ectodermo la expresión del gen *Distal-less*, probablemente haciendo que éste responda a algún factor en el mesénquima.

Proliferación de las células del blastema: el requerimiento de FGF10

El factor mesenquimático probablemente es FGF10. FGF10 se expresa en el mesénquima de los esbozos de extremidades embrionarias normales y este mismo factor produce una diferencia crítica en la regeneración de la extremidad del anfibio. En *Xenopus*, por ejemplo, los renacuajos premetamórficos son capaces de regenerar sus extremidades posteriores, pero no lo son los renacuajos de estadios tardíos y adultos. Por medio de experimentos de trasplantes recíprocos, Yokoyama y col. (2000) hallaron que el mesénquima, no el ectodermo, era crítico en la regulación de la regeneración. Una extremidad posterior regeneraría si ésta tuviera el mesénquima de una extremidad posterior premetamórfica y el ectodermo de una extremidad posterior más vieja; ésta no regeneraría si tuviera el ectodermo premetamórfico y mesénquima más viejo. Este último mesénquima de la extremidad posterior no sintetiza FGF10. Cuando Yokoyama y sus colegas (2001) agregaron bolitas de FGF10 a extremidades posteriores más viejas, estas extremidades regeneraron (fig. 18-22). Además, las bolitas de FGF10 indujeron la expresión de *fgf8* en el ectodermo que recubría la bolita.

Por lo tanto, la regeneración de la extremidad del anfibio puede ser muy semejante a su desarrollo original. En ambos casos, hay una retroalimentación entre el FGF10 producido en el mesénquima y el FGF8 producido en el ectodermo que lo recubre (CAE en el desarrollo de la extremidad de los amniotas, capuchón apical ectodérmico en la regeneración del anfibio). La condición inicial es la expresión de FGF para hacer competente al ectodermo para expresar su propio FGF. Esta función parece ser llevada a cabo por la lámina del mesodermo lateral durante el desarrollo y por las neuronas durante la regeneración.

Formación del patrón en el blastema de regeneración

El blastema de regeneración se asemeja al mesénquima de la zona de progreso de la extremidad en desarrollo en muchos sentidos. Los ejes dorsoventral y anteroposterior entre el muñón y el tejido en regeneración están conservados y los estudios celulares y moleculares han confirmado que los mecanismos de establecimiento del patrón de las extremidades en desarrollo y en regeneración son muy semejantes. Mediante el trasplante de blastemas de extremidades en regeneración hacia esbozos de extremidades en desarrollo, Muneoka y Bryant (1982) demostraron que las células del blastema pueden responder a señales del esbozo de la extremidad y contribuir al desarrollo de la extremidad. A nivel molecular, tal como se observa a Sonic hedgehog en la región posterior del mesénquima de la zona de progreso de la extremidad en desarrollo, éste es observado temprano en la región posterior del blastema de regeneración (Imokawa y Yoshizato 1997; Torok y col. 1999). El patrón inicial de expresión génica Hox en las extremidades en regeneración no es el mismo que el de las extremidades en desarrollo. Sin

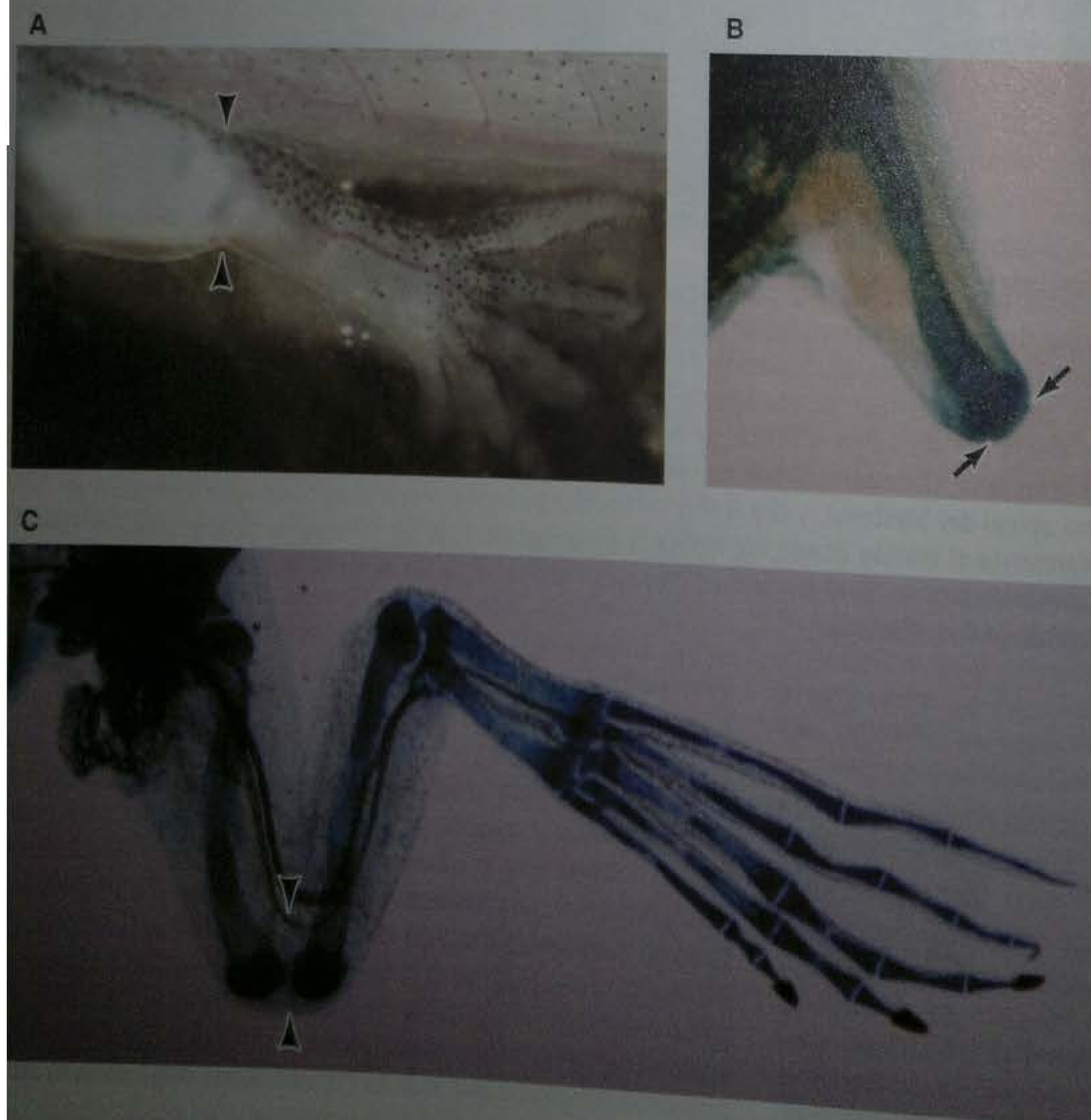


Fig. 18-22. Restauración de la capacidad regenerativa de la extremidad posterior de *Xenopus* mediante FGF10. **A.** Una extremidad tardía de renacuajo es amputada a nivel de la rodilla. Las cabezas de flecha muestran el sitio de la amputación. **B.** Si sobre el sitio de amputación se colocan bolitas que carecen de FGF10, no hay regeneración. La flecha marca el sitio de amputación y el cartílago de la extremidad está teñido con alcian blue. **C.** Las bolitas que contienen FGF10 colocadas sobre el sitio de amputación dan como resultado la regeneración de estructuras distales completas (algunas de las cuales tienen garras). Las cabezas de flecha marcan el sitio de amputación. (Según Yokohama y col. 2001; fotografías cortesía del Dr. K. Tamura.)

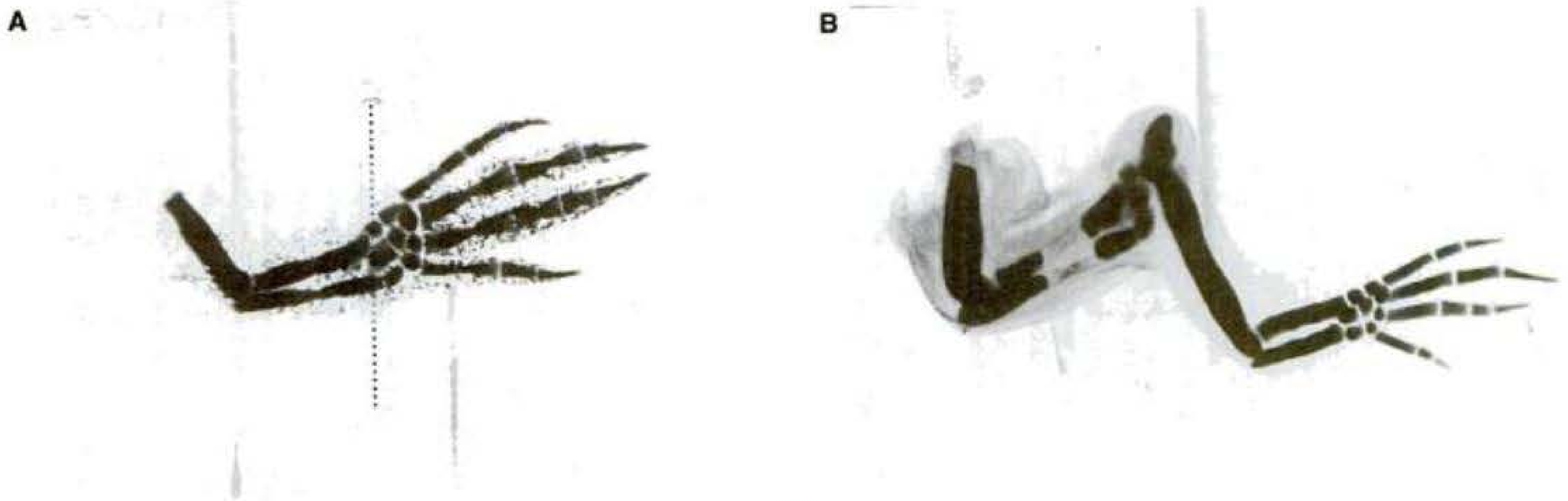


Fig. 18-23. Efectos de la vitamina A (un retinoide) sobre las extremidades de la salamandra en regeneración. **A.** Extremidad de *Ambystoma mexicanum* regenerada normal (9X) con húmero, cúbito y radio, carpo y dígitos. La línea punteada muestra el plano de amputación a través del área del carpo. **B.** Regeneración después de la amputación en la misma localización (5X), pero después de la regeneración el animal ha sido colocado en retinol palmitato (vitamina A) por 15 días. Ha surgido un nuevo húmero, cúbito, radio, una serie del carpo y una serie de dígitos. (De Maden y col. 1982; fotografías cortesía de M. Maden.)

embargo, el patrón anidado de expresión génica de Hoxa y Hoxd característico de la extremidad en desarrollo es establecido a medida que la extremidad regenera (Torok y col. 1998).

Esta expresión génica Hox puede ser controlada por ácido retinoico. Si animales en regeneración son tratados con concentraciones suficientes de ácido retinoico (o de otros retinoides), sus extremidades regeneradas tendrán duplicaciones a lo largo del eje proximodistal (fig. 18-23; Niazi y Saxena 1978; Maden 1982). Esta respuesta es dependiente de la dosis y la dosis máxima puede dar como resultado una regeneración completa de una extremidad nueva (comenzando en el hueso más proximal), sin importar el nivel original de amputación. Dosis más elevadas que éstas dan como resultado la inhibición de la regeneración. Parece que el ácido retinoico hace que las células sean reespecificadas hacia una posición más proximal (fig. 18-24; Crawford y Stocum 1988b; Pecorino y col. 1996). Además, las células del blastema pueden experimentar **transdiferenciación** (Okada 1995; Tsonis y col. 1995): las células que han sido diferenciadas a músculo pueden convertirse a tejido cartilaginoso.

El ácido retinoico es sintetizado en la herida de la epidermis de la extremidad en regeneración y forma un gradiente a lo largo del eje proximodistal del blastema (Brockes 1992; Scadding y Maden 1994; Viviano y col. 1995). Se piensa que este gradiente de ácido retinoico activa a los genes Hoxa diferencialmente a través del blas-

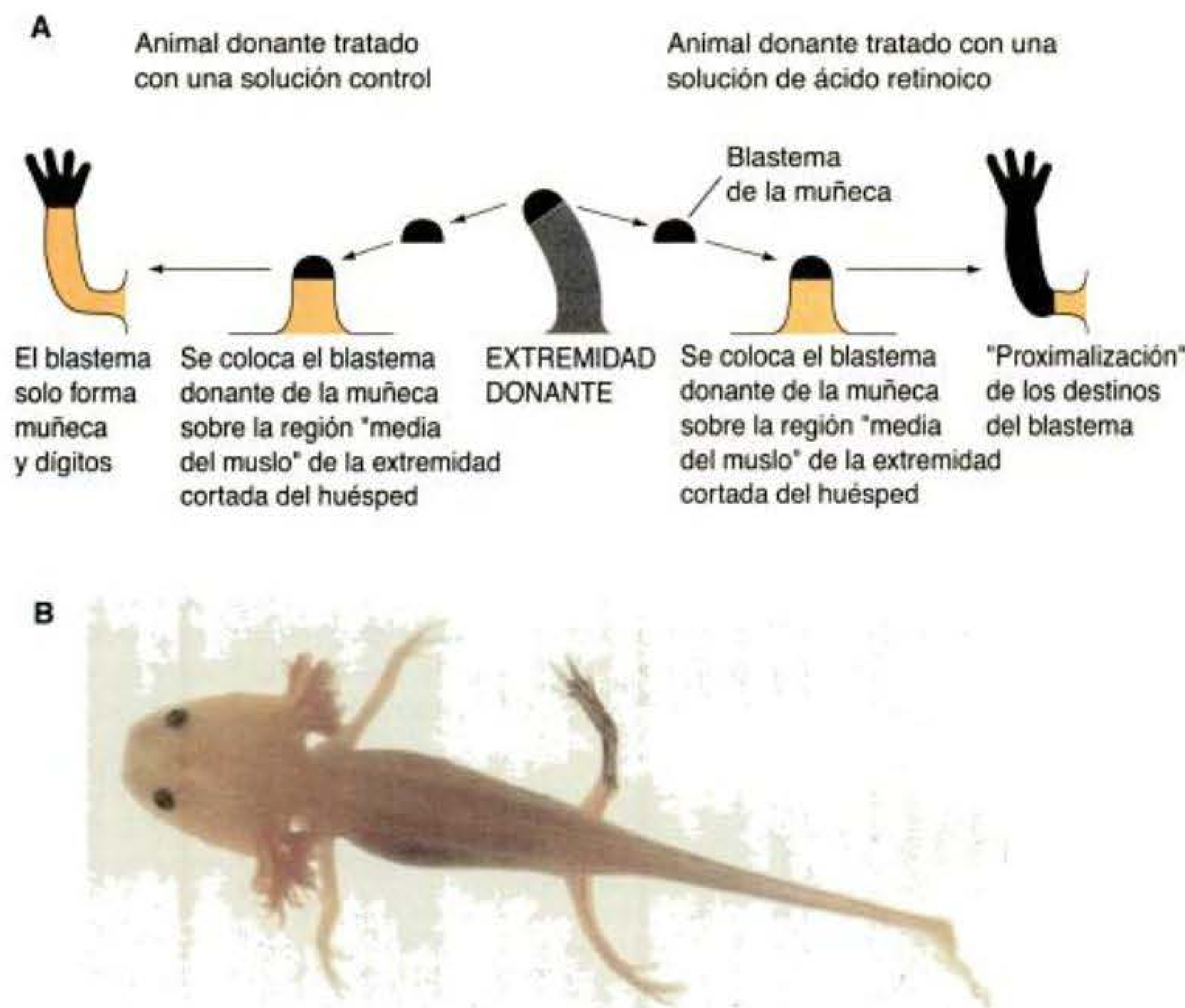


Fig. 18-24. Proximalización por ácido retinoico de la reespecificación del blastema. **A.** Cuando un blastema de la muñeca de una extremidad de axolote cortado recientemente es colocado sobre la extremidad posterior cortada de un huésped a nivel de la mitad del muslo, éste solo generará la muñeca. El huésped (cuya propia pierna fue extirpada) llenará el espacio y regenerará la extremidad hasta la muñeca. Sin embargo, si el animal donante es tratado con ácido retinoico, el blastema de la muñeca regenerará una extremidad completa y cuando sea injertado no podrá hacer que el huésped llene el espacio. **B.** Un blastema de la muñeca desde un axolote pigmentado oscuro fue tratado con ácido retinoico y colocado sobre la región media del muslo amputada de un axolote dorado. El blastema tratado regeneró una extremidad completa. (Según Crawford y Stocum 1998a,b; fotografía cortesía de K. Crawford.)

tema, resultando en la especificación del patrón en la extremidad en regeneración. Gardiner y colegas (1995) han demostrado que el patrón de expresión de ciertos genes Hoxa en las células distales del blastema de regeneración es cambiado por ácido retinoico exógeno hacia un patrón de expresión característico de las células más proximales. Es probable que durante la regeneración normal, la herida de la epidermis/capuchón apical ectodérmico secrete ácido retinoico, que activa a los genes necesarios para la proliferación celular, regula en menos a los genes que son específicos para las células diferenciadas y activa a una serie de genes Hox que le dicen a las células dónde están en la extremidad y cómo necesitan crecer. Se desconoce el mecanismo por el cual los genes Hox hacen esto, pero se han observado cambios en la adhesión célula-célula y de otras cualidades de superficie de las células (Nardi y Stocum 1983; Stocum y Crawford 1987; Bryant y Gardiner 1992).

Por lo tanto, en la regeneración de la extremidad de la salamandra, las células del adulto pueden "volver al futuro," retornando a una condición "embrionaria" para comenzar la formación de la extremidad nuevamente.

SITIO WEB 18.5 **Los modelos de coordinadas polares y de límites (The polar coordinate and boundary models).** El fenómeno de regeneración epimórfica puede ser visto formalmente como un acontecimiento que restablece la continuidad entre los tejidos que la amputación ha cortado. Los modelos de coordinadas polares y de límites intentan explicar los numerosos fenómenos de la regeneración de la extremidad.

SITIO WEB 18.6 **Regeneración en gusanos anélidos (Regeneration in annelid worms).** Un ejercicio fácil de laboratorio puede descubrir las reglas por las que los gusanos regeneran sus segmentos. Este sitio web detalla algunos de aquellos experimentos.

Regeneración morfaláctica en Hidra

*Hydra** es un género de cnidarios de agua dulce. La mayoría de las hidras mide cerca de 0,5 cm. Posee un cuerpo tubular, con una "cabeza" en el extremo distal y un "pie" en el extremo proximal. El "pie," o **disco basal**, le permite adherirse a las rocas o a la parte inferior de las plantas de las lagunas. La "cabeza" consiste en una región **hipostoma** cónica (que contiene la boca) y un anillo de tentáculos (que atrapan la comida) por debajo de ésta. La hidra tiene solo dos capas epiteliales: el ectodermo y el endodermo y carece de un verdadero mesodermo. Puede reproducirse sexualmente, pero solo lo hace bajo condiciones adversas, como en superpoblación o cuando el tiempo se torna frío. Con frecuencia, las hidras se multiplican mediante la gemación de nuevos individuos (Martin 1997; fig. 18-25A). Las yemas se forman cerca de los dos tercios del camino hacia abajo del eje corporal.

El cuerpo de la hidra no es tan "estable" como los de la mayoría de los organismos. En los seres humanos y las moscas, por ejemplo, una célula de la piel en el tronco no se espera que migre a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo para ser finalmente mudada de la cara o del pie; pero esto es lo que precisamente sucede en *Hydra*. Las células de la columna del cuerpo están constantemente en mitosis y las células son finalmente desplazadas hacia las extremidades de la columna, desde donde son desprendidas (fig. 18-25B, Campbell 1967a,b). Por lo tanto, cada célula llega a desempeñar varios papeles, según

* La *Hydra* es otro personaje de la mitología griega. Cada vez que una de las cabezas de la serpiente de muchas cabezas se cortaba, ésta regeneraba dos nuevamente. Hércules finalmente derrotó a la *Hydra* al cauterizar el muñón de su cabeza con fuego. Hércules tenía un interés antiguo en la regeneración, debido a que él fue también el héroe que finalmente liberó al atado Prometeo, deteniendo de este modo las hepatectomías diarias.

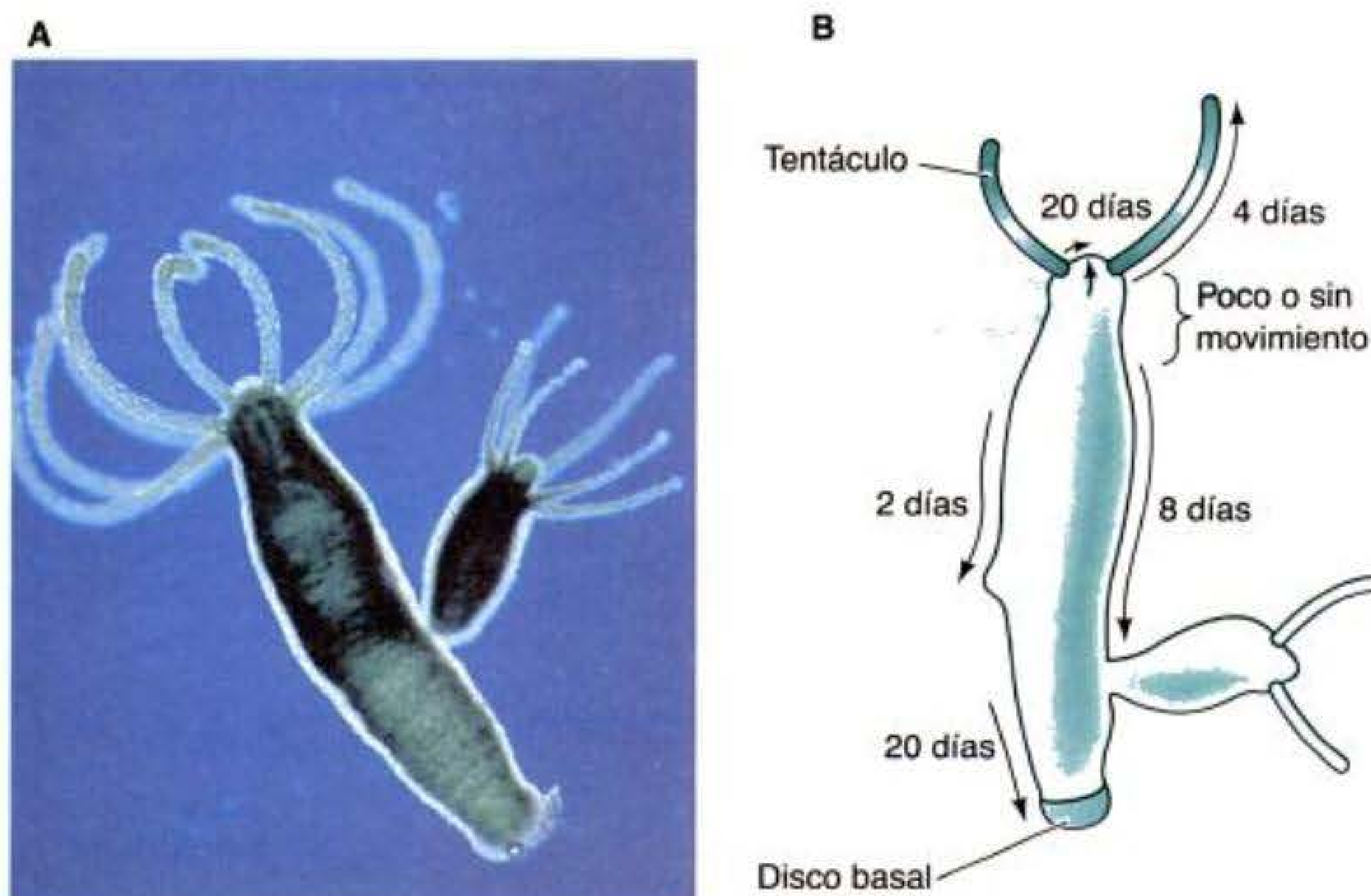


Fig. 18-25. Gemación en *Hydra*. **A.** Yema individual nueva desde el lado derecho de un adulto. **B.** Los movimientos celulares en *Hydra* fueron trazados siguiendo la migración de los tejidos marcados. Las flechas indican las posiciones de salida y de eliminación de las células marcadas. Las regiones entre paréntesis están donde no tienen lugar movimientos celulares. La división celular tiene lugar a través de la columna del cuerpo excepto en los tentáculos y en el pie (sombreado). (**A**, fotografía © Biophoto/Photo Researchers Inc.; **B**, según Steele 2002.)

cuán vieja sea y las señales que están especificando el destino celular deben estar activas todo el tiempo.

Si la columna del cuerpo de la hidra es cortada en varios trozos, cada trozo regenerará una cabeza en su extremo apical original y un pie en su extremo basal original. No se requiere división celular para que esto suceda y el resultado es una hidra pequeña. Debido a que cada célula conserva su plasticidad, cada trozo puede volver a formar un organismo más pequeño. Este tipo de regeneración es conocido como morfalaxis.

El gradiente de activación de la cabeza

Los experimentos antes descritos demuestran que cada porción de la columna corporal de la hidra a lo largo del eje apicobasal es potencialmente capaz de formar una cabeza y un pie. Sin embargo, la polaridad de la hidra está coordinada por una serie de gradientes morfogenéticos que permiten que la cabeza se forme solamente en un lugar y que el disco basal se forme únicamente en otro. La evidencia de tales gradientes en hidras se obtuvo por primera vez a partir de experimentos de injerto comenzados por Ethel Browne en los comienzos del 1900. Cuando tejido de hipostoma de una hidra es trasplantado hacia la región media de otra , forma un nuevo eje apicobasal, con el hipostoma extendiéndose hacia afuera (fig. 18-26A). Cuando un disco basal es injertado hacia la zona media de una hidra huésped, también se forma un nuevo eje, pero con la polaridad opuesta, extendiéndose un disco basal (fig. 18-26B). Cuando los tejidos de ambos extremos son trasplantados simultáneamente hacia la región media del huésped, no se forma un nuevo eje o el nuevo eje tiene poca polaridad (fig. 18-26C; Browne 1909; Newman 1974). Estos experimentos han sido interpretados para indicar la existencia de un **gradiente de activación de la cabeza** (más elevado en el hipostoma) y un **gradiente de activación del pie** (más elevado en el disco basal).

El gradiente de activación de la cabeza puede ser medido mediante el implante de anillos de tejido desde varios niveles de una hidra donante hacia una región particular del tronco del huésped (Wilby y Webster 1970; Herlands y Bode 1974; MacWilliams 1983b). Cuanto más elevado es el nivel de activador de cabeza en el tejido donante, mayor será el porcentaje de implantes que inducirán la formación de nuevas cabezas. El factor de activación de la cabeza está concentrado en la cabeza y decrece linealmente hacia el disco basal.

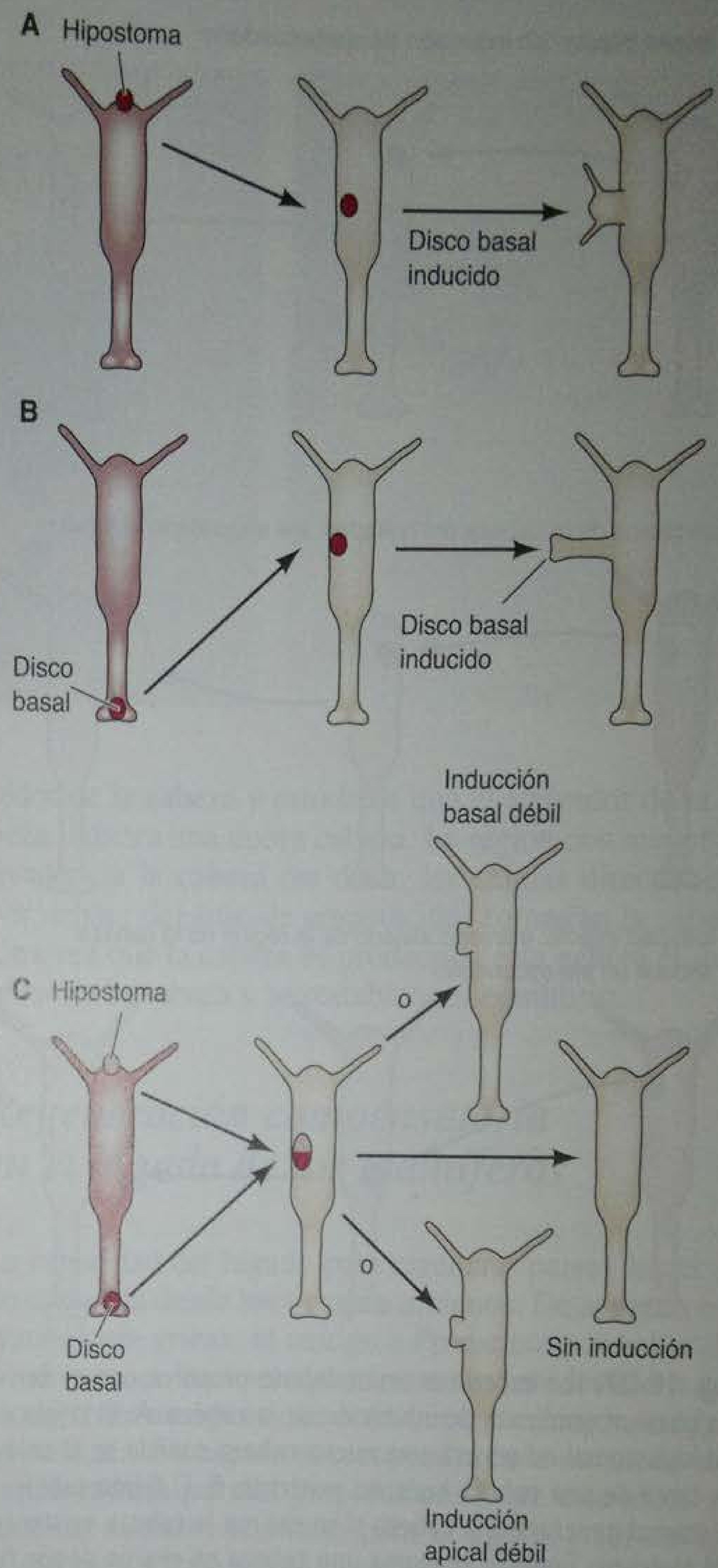


Fig. 18-26. Experimentos de injerto que demuestran diferentes capacidades morfogenéticas en diferentes regiones del eje apicobasal de *Hydra*. **A.** Tejido de hipostoma injertado sobre un tronco huésped induce un eje secundario con un hipostoma extendido. Tejido del disco basal injertado sobre un tronco huésped induce un eje secundario con un disco basal extendido. **C.** Si los tejidos del hipostoma y del disco basal son trasplantados en conjunto, solamente se observan, si sucede, inducciones débiles. (Según Newman 1974.)

El gradiente de inhibición de la cabeza

Si el tejido de la columna del cuerpo de la hidra es capaz de formar una cabeza, ¿por qué, entonces, no lo hace? En 1926, Rand y sus colegas demostraron que la regeneración normal del hipostoma es inhibida cuando un hipostoma intacto se injerta adyacente al sitio de amputación. Además, si un injerto o tejido subhipostomal (de la región justo por debajo del hipostoma, donde hay una concentración relativamente elevada de activador de la cabeza) es colocado en la misma región de una hidra huésped, no se forma un eje secundario (fig. 18-27A). Sin embargo, si se injerta tejido subhipostomal a una hidra huésped decapitada (fig. 18-27B), se forma un segundo eje. La cabeza del huésped parece producir un inhibidor que impide que el tejido injertado forme una cabeza y un eje secundario. Un gradiente de este inhibidor parece extenderse desde la cabeza descendiendo hacia la columna del cuerpo, y puede ser medido mediante el injerto de tejido subhipostomal hacia varias regiones a lo largo del tronco de hidras huéspedes. Este tejido no producirá una cabeza cuando sea implantado en el área apical de una hidra huésped intacta, sino que formará una cabeza si es colocado en posiciones más bajas sobre el huésped (fig. 18-27A,C). Por lo tanto, hay un gradiente de inhibidor de la cabeza así como de activador de la cabeza (Wilby y Webster 1970; MacWilliams 1983a).

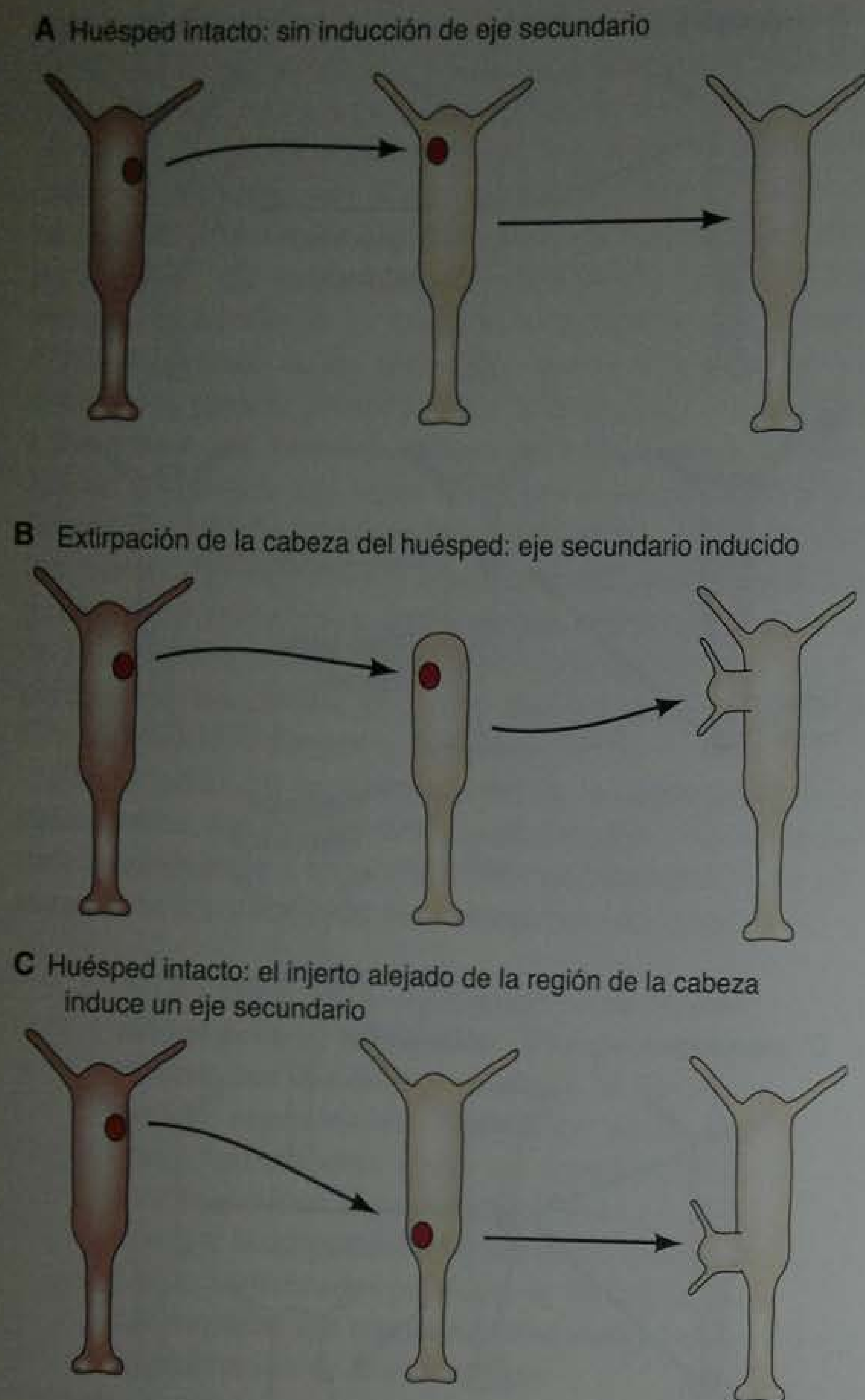


Fig. 18-27. Los experimentos de injerto proporcionan evidencia para un gradiente de inhibición de la cabeza. **A.** El tejido subhipostomal no genera una nueva cabeza cuando se lo coloca cerca de una cabeza huésped existente. **B.** El tejido subhipostomal generará una cabeza si se extirpa la cabeza existente del huésped. También se forma una cabeza en el sitio donde fue amputada la cabeza del huésped. **C.** El tejido subhipostomal generará una nueva cabeza cuando se coloca alejado de una cabeza huésped existente. (Según Newman 1974.)

El hipostoma como un "organizador"

Ethel Browne (1909; Lenhoff 1991) observó que el hipostoma actuaba como un "organizador" de la hidra. Esta idea ha sido confirmada por Braun y Bode (2002), quienes demostraron que: 1) cuando es trasplantado, el hipostoma puede inducir al tejido huésped a formar un eje corporal secundario, 2) el hipostoma produce las señales de activación y de inhibición de la cabeza, 3) el hipostoma es la única región "autodiferenciante" de la hidra y 4) la señal de inhibición de la cabeza es, en realidad, una señal para inhibir la formación de nuevos centros organizadores.

Mediante la inserción de pequeños trozos de tejido del hipostoma en una hidra huésped que ha sido marcada con tinta India (*India ink*) (carbón coloidal), Braun y Bode hallaron que el hipostoma inducía un nuevo eje corporal y que la mayor parte del tejido de la cabeza obtenido provenía del tejido *huésped*, no desde la diferenciación del tejido donante. En cambio, cuando los tejidos desde otras regiones (tales como la región subhipostomal) fueron injertados hacia un tronco huésped, la cabeza y el tronco apical de una nueva hidra fueron producidos desde el tejido *donante* injertado (fig. 18-28). En otras palabras, sólo la región del hipostoma pudo alterar los destinos de las células del tronco, haciendo que ellas se conviertan en células de la cabeza. Braun y Bode también hallaron que la señal no tenía que emanar desde un injerto permanente. Incluso el contacto transitorio con la región del hipostoma fue suficiente para inducir un nuevo eje desde una hidra huésped. En estos casos, *todos* los tejidos del nuevo eje vienen desde el huésped. El inhibidor de la cabeza parece reprimir el efecto de la señal inductora desde el hipostoma donante y éste funciona normalmente para evitar que otras porciones de la hidra tengan tales capacidades organizadoras.

Se conocen al menos dos genes que son activos en el área organizadora del hipostoma y su expresión es una buena señal para la existencia de una serie de señales conservadas evolutivamente que funcionan como organizadores a lo largo de todo el reino animal. En primer lugar, la proteína Wnt de *Hydra* se observa en el extremo apical de la yema temprana y define la región del hipostoma a medida que la yema se alarga (Hobmayer y col. 2000; fig. 18-29). En segundo lugar, la expresión de otra molécula organizadora de vertebrados, Goosecoid, está restringida a la región del hipostoma de *Hydra*. Además, cuando el hipostoma es llevado en contacto con el tronco de una hidra adulta, ésta induce la expresión de *Brachyury* (aun aunque *Hydra* carezca de mesodermo), tal como lo hacen los organizadores de los vertebrados (Braun y col. 1999; Braun y Bode 2002).

SITIO WEB 18.7 **Ethel Browne y el organizador (Ethel Browne and the organizer).** Spemann y Mangold trajeron el concepto de organizador a la embriología y el laboratorio de Spemann ayudó a hacer de esta idea un concepto unificado en la embriología. Sin embargo, se ha discutido que esta idea tuvo sus orígenes en los experimentos de Ethel Browne sobre *Hydra*.

La activación del disco basal y los gradientes de inhibición

El disco basal tiene propiedades que sugieren que éste es la fuente de un gradiente de inhibición del pie y de un gradiente de activación del pie (MacWilliams y col. 1970; Hicklin y Wolpert 1973; Schmidt y Schaller 1976; Meinhardt 1993; Grens y col. 1999). Los gradientes de inhibición para la cabeza y el pie pueden ser importantes en la determinación de dónde y cuándo se puede formar una yema. En las hidras adultas jóvenes, los gradientes inhibidores de la cabeza y del pie parecen bloquear la formación de la yema. Sin embargo, a medida que la hidra crece, las fuentes de estas sustancias lábiles se distancian cada vez más, creando una región de tejido casi dos tercios por debajo del tronco donde los niveles de inhibidores son mínimos. Esta región es donde se forma la yema (fig. 18-30; Shostak 1974; Bode y Bode 1984; Schiliro y col. 1999).

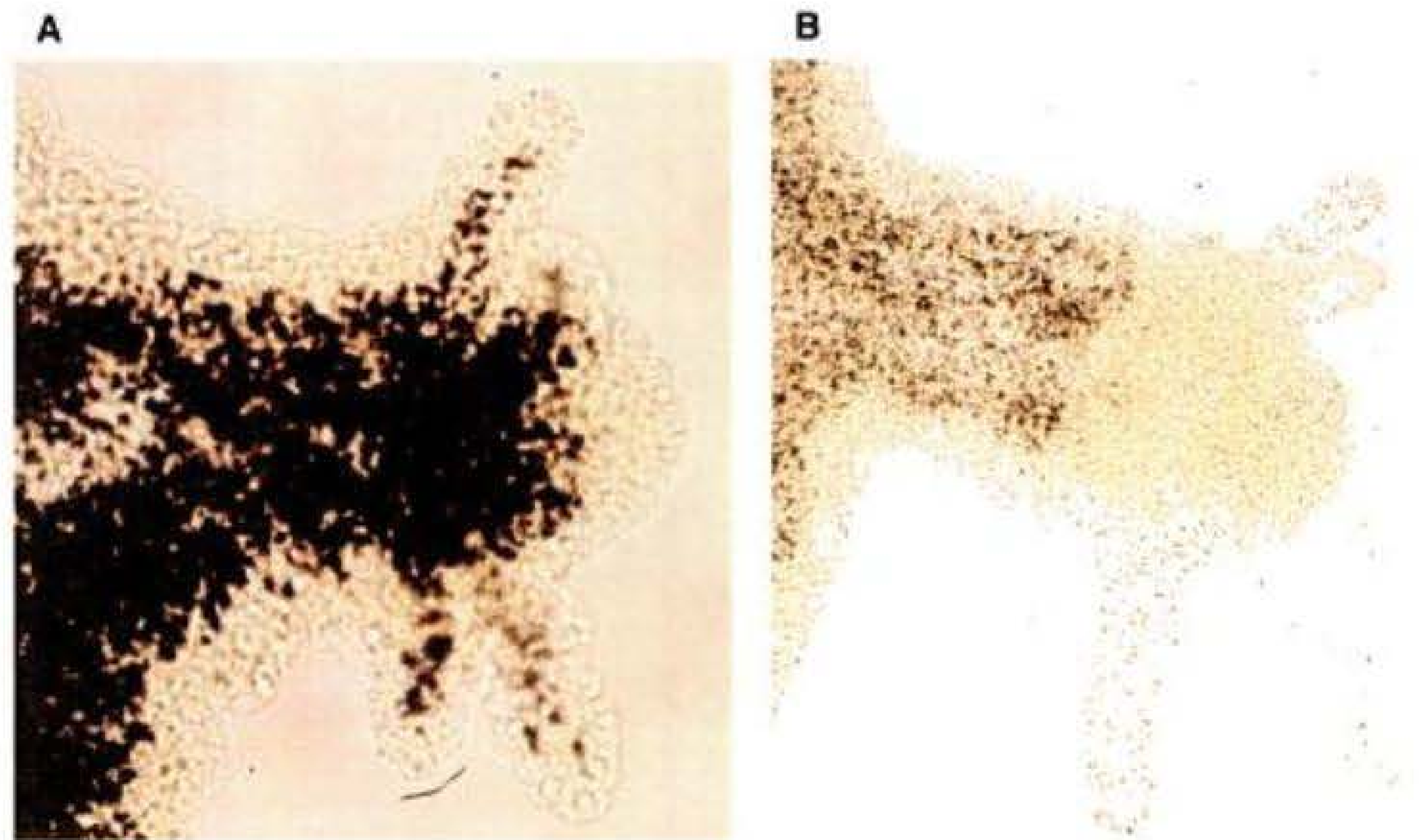


Fig. 18-28. Formación de ejes secundarios a continuación del trasplante de regiones de la cabeza hacia el tronco de una hidra. El endodermo de la hidra huésped ha sido teñido con tinta India. **A.** Cuando tejido de hipostoma es injertado en un tronco huésped, induce al tejido del tronco a convertirse en tentáculos y cabeza. **B.** Cuando el tejido subhipostomal es colocado sobre el tronco del huésped, se autodiferencia hacia una cabeza y el tronco superior. (De Braun y Bode 2002; microfotografías cortesía de H. R. Bode.)

Ciertos mutantes de *Hydra* tienen defectos en su capacidad para formar yemas y estos defectos pueden ser explicados por alteraciones de los gradientes de inhibición. El mutante *L4* de *Hydra magnipapillata*, por ejemplo, forma yemas muy lentamente y solo después de alcanzar un tamaño cerca del doble de la longitud como en los individuos tipo salvaje. Se encontró que la cantidad de inhibidor de la cabeza en estos mutantes era mucho más grande que en *Hydra* tipo salvaje (Takano y Sugiyama 1983).

Se han encontrado varios péptidos que activan la formación del pie, pero no se conocen los mecanismos por los cuales ellos se originan y funcionan (véase Harafuji y col. 2001). Sin embargo, la especificación de células a medida que migran desde la región basal a través de la columna del cuerpo puede ser mediada por un gradiente de tirosina cinasa. El producto del gen *shin guard* es una tirosina cinasa que se extiende en un gradiente desde el ectodermo justo debajo del disco basal a través de la región media del tronco. Los brotes parecen formarse donde este gradiente pierde intensidad (fig. 18-30B). El gen *shin guard* parece ser activado mediante el producto del gen *manacle*, un factor de transcripción putativo que es expresado tempranamente en el ectodermo del disco basal.

Los gradientes de inhibición y de activación también informan a la hidra "qué extremo es arriba" y especifican los valores posicionales a lo largo del eje apical-basal. Cuando la cabeza es extirpada, no se produce más inhibidor de la cabeza y esto hace que el activador de la cabeza induzca una nueva cabeza. La región con mayor activador de la cabeza (es decir, las células directamente por debajo del sitio de amputación) formarán la cabeza. Una vez que la cabeza es producida, ésta genera el inhibidor de la cabeza y se restablece el equilibrio.

Regeneración compensatoria en el hígado de los mamíferos

La capacidad del hígado para regenerar parece haber sido conocida desde los tiempos antiguos. De acuerdo con la mitología griega, el castigo a Prometeo (por haber dado el fuego a los humanos) fue estar encadenado a una roca y tener un águila que comía una porción de su hígado cada día. Su hígado se recuperaba cada noche de esta **hepatectomía parcial** proporcionando de este modo un sustento nutritivo continuo para el águila y un castigo eterno para Prometeo. Actualmente, el ensayo estándar para la regeneración del hígado es extirpar (después de aplicar anestesia) lóbulos específicos del hígado (es decir, una hepatectomía parcial), dejando a los otros intactos. El lóbulo extirpado no vuelve a crecer, pero los lóbulos restantes aumentan de tamaño para compensar la pérdida del tejido hepático desaparecido (Higgins y Anderson 1931). La cantidad de hígado regenerado es equivalente a la cantidad de hígado extirpado.

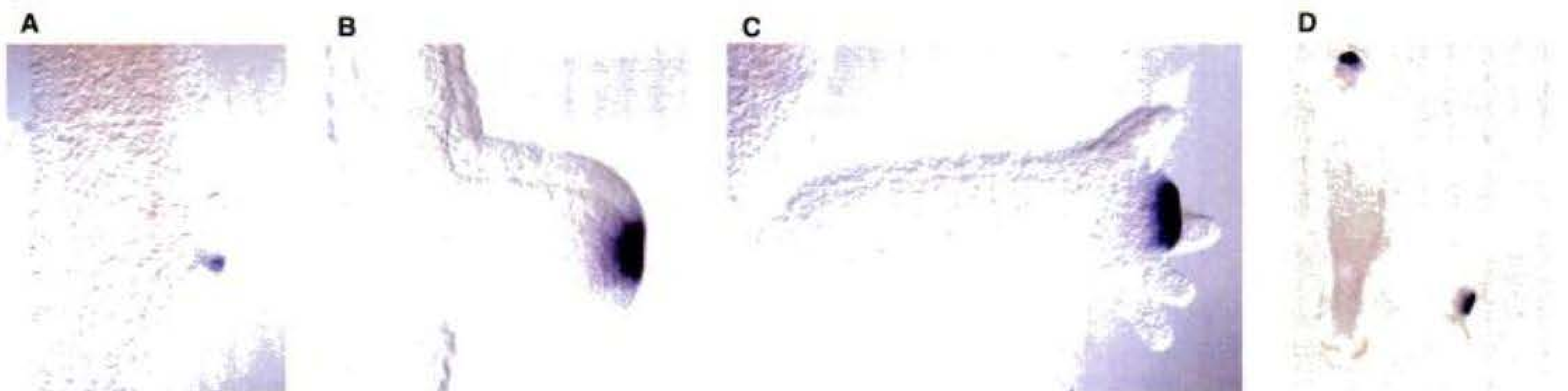


Fig. 18-29. Expresión del gen Wnt de *Hydra* durante la gemación. **A.** Yema temprana. **B.** Yema estadio medio. **C.** Yema con tentáculos tempranos. **D.** Adulto con yema tardía. (De Hobmayer y col. 2000; microfotografías cortesía de T. W. Holstein.)

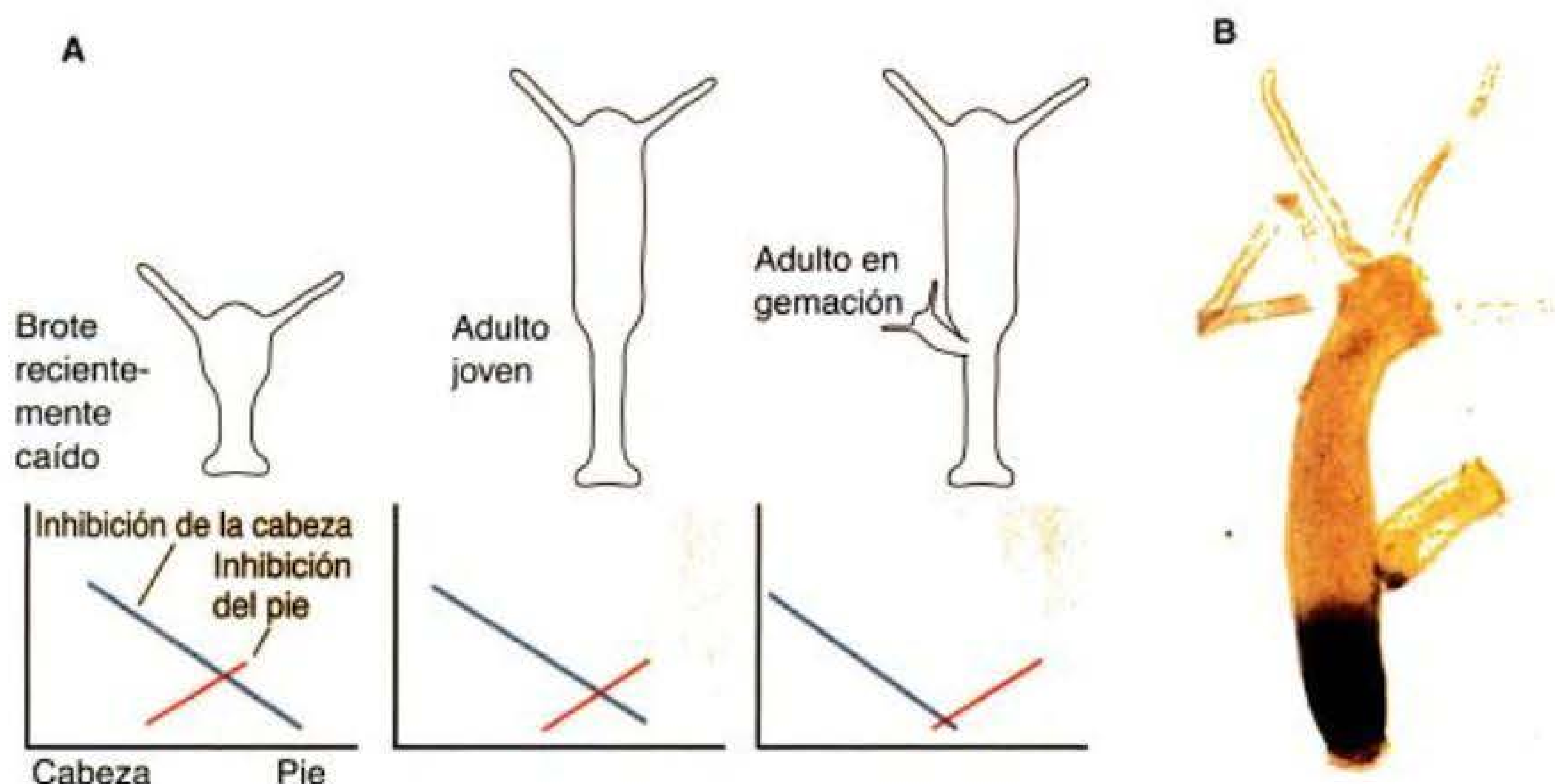


Fig. 18-30. Localización de la yema como una función de los gradientes de inhibición de la cabeza y del pie. **A.** Gradientes de inhibición de la cabeza (línea azul) y de inhibición del pie (línea roja) en adultos jóvenes con yemas recientemente desprendidas y adultos en gemación. **B.** Expresión de la proteína Shin guard de un modo graduado en una hidra en gemación (**A**, según Bode y Bode 1984; **B**, según Bridge y col. 2000.)

El hígado regenera por la proliferación de tejidos existentes. De manera sorprendente, las células hepáticas en regeneración no están completamente desdiferenciadas cuando vuelven a ingresar al ciclo celular. No se forma blastema de regeneración. En su lugar, los cinco tipos de células hepáticas –hepatocitos, células de los conductos, células almacenadoras de grasa (Ito), células endoteliales y macrófagos de Kupffer– comienzan a dividirse para producir más de sí mismas (fig. 18-31). Cada tipo de células conserva su identidad celular y el hígado conserva la capacidad para sintetizar las enzimas específicas del hígado necesarias para la regulación de la glucosa, de la degradación de toxinas, de la síntesis de bilis, de la producción de albúmina y de otras funciones hepáticas (Michalopoulos y DeFrances 1997).

En el hígado en regeneración, como en la regeneración de la extremidad de la salamandra, hay un regreso a algunas condiciones embrionarias. Se producen los factores de transcripción y los productos fetales como las ciclinas que controlan la división. Pero el retorno al estado embrionario no es tan completo como en el anfibio. Aunque son necesarios otros factores paracrinos y endocrinos para la regeneración del hígado, una de las proteínas más importantes para retornar a las células del hígado al ciclo celular es el **factor de crecimiento de hepatocito** (**HGF**; del inglés, *hepatocyte growth factor*). Esta proteína, también conocida como **factor scatter** (dispersar) (véase capítulo 11), induce muchas de las proteínas embrionarias. Dentro de la hora después de la hepatectomía parcial, el nivel sanguíneo de HGF ha aumentado unas 20 veces (Lindroos y col. 1991). Sin embargo, los hepatocitos que todavía están conectados entre sí en un epitelio no pueden responder al HGF. El trauma de la hepatectomía parcial puede activar a las metaloproteinasas, que digieren la matriz extracelular, y permitir a los hepatocitos separarse y proliferar. Estas enzimas también pueden segmentar al HGF hacia su forma activa (Mars y col. 1995). Los mecanismos por los cuales estos factores interactúan y por los que se le dice al hígado que detenga la regeneración después de alcanzar el tamaño apropiado continúan sin ser descubiertos.

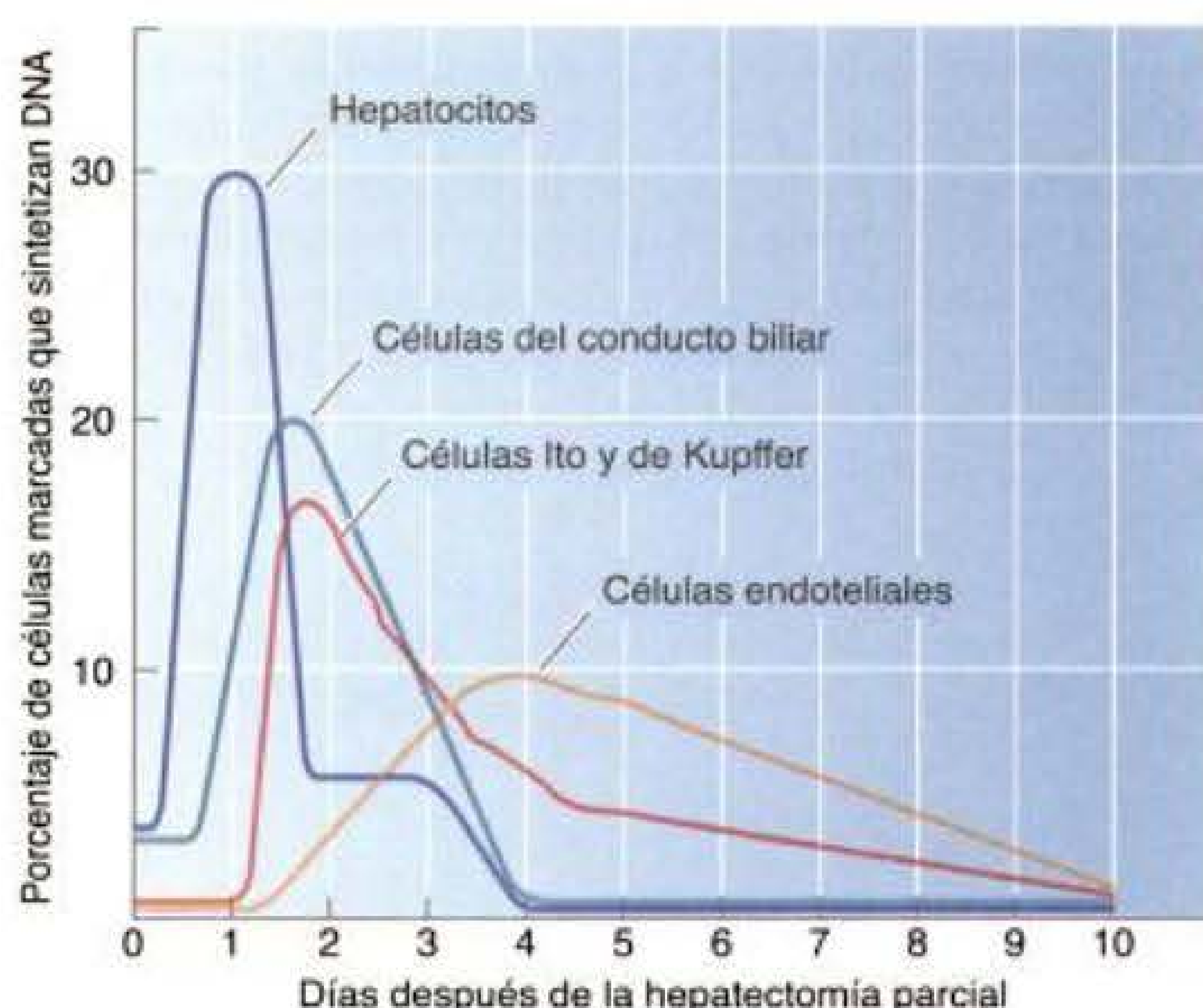


Fig. 18-31. Cinética de la síntesis de DNA en los cinco tipos celulares principales del hígado de mamíferos después de la hepatectomía parcial. Es posible que, debido a que los hepatocitos responden más rápido, secreten factores paracrinos que inducen la replicación del DNA en otras células. (Según Michalopoulos y DeFrances 1997.)

Envejecimiento: la biología de la senescencia

La entropía siempre gana. Cada organismo multicelular, que utiliza energía desde el sol, es capaz de desarrollar y mantener su identidad solo por cierto tiempo. Luego, el deterioro prevalece sobre la síntesis, y el organismo envejece. El **envejecimiento** puede definirse como el deterioro relacionado con el tiempo de las funciones fisiológicas necesarias para la supervivencia y la fertilidad. Las características del envejecimiento –distinguidas de las enfermedades del envejecimiento (como cáncer y enfermedad cardíaca)– afectan a todos los individuos de una especie. Hay dos temas principales en la investigación sobre el envejecimiento. El primero, tiene que ver con cuánto vive un organismo; el segundo, con el deterioro fisiológico o **senescencia**, que caracteriza a la edad avan-

zada. Estos temas se ven con frecuencia como interrelacionados.

Muchos biólogos evolutivos (Medawar 1952; Kirkwood 1977) han negado que el envejecimiento sea parte del repertorio genético del animal. En su lugar, ellos consideran a la senescencia como el estado por defecto que se produce después de que el animal ha cumplido los requerimientos de la selección natural. Después de que sus crías han nacido y crecido, el animal puede morir. En efecto, en muchos organismos, desde las polillas al salmón, esto es exactamente lo que sucede: tan pronto como los gametos femeninos son fecundados y los huevos depositados, los adultos mueren. Sin embargo, como se verá más adelante, estudios recientes han indicado que hay componentes genéticos que regulan el ritmo de envejecimiento y que la alteración de la actividad de expresión de estos genes puede alterar el tiempo de vida de un individuo. De hecho, evidencia reciente (resumida en Kenyon 2001) ha demostrado que algunos de estos componentes genéticos podrían estar conservados evolutivamente. Las moscas, los gusanos y los mamíferos parecen utilizar el mismo grupo de genes para promover la supervivencia y la longevidad.

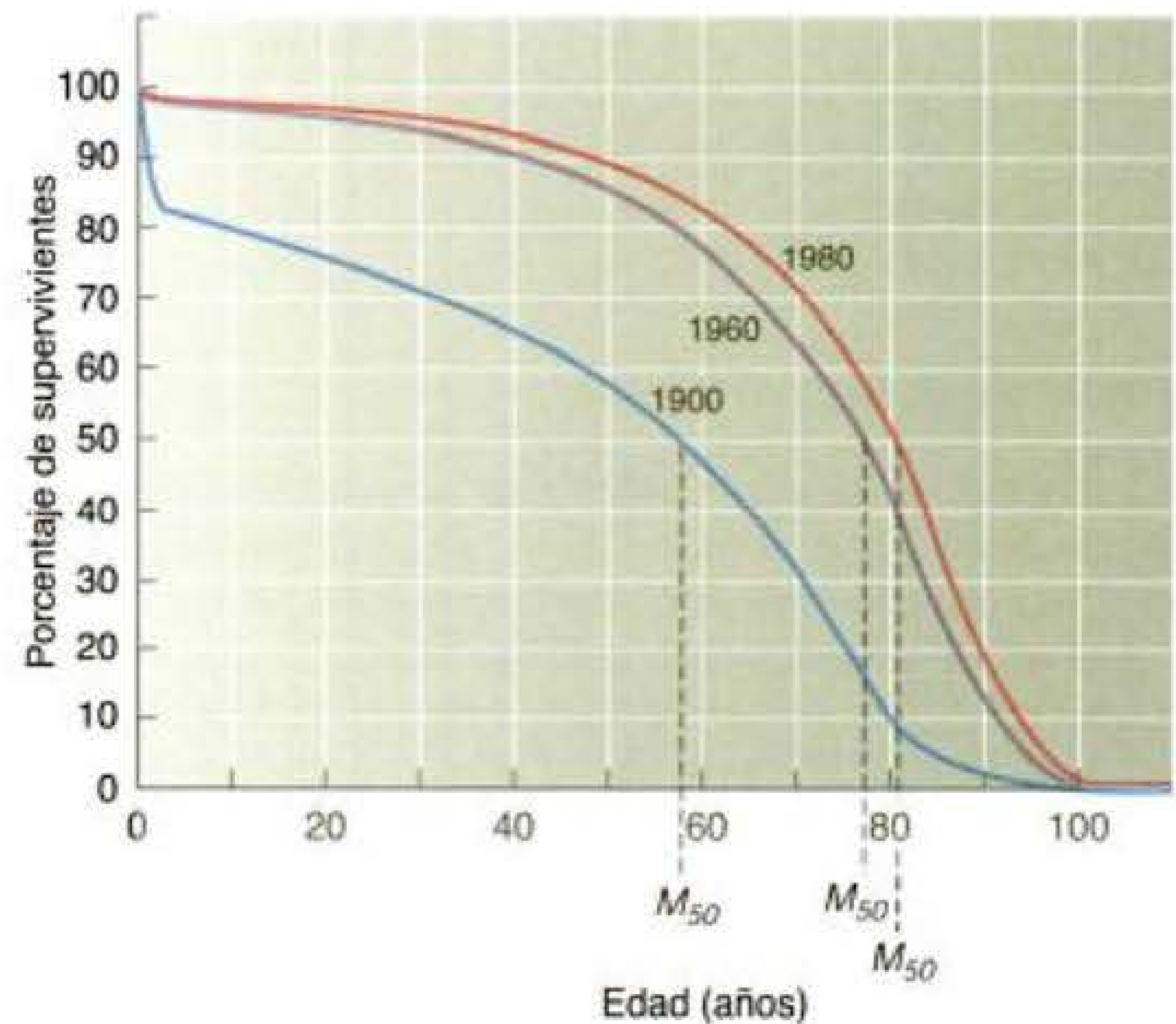


Fig. 18-32. Curva de supervivencia para las mujeres de los EE.UU. en 1900, 1960 y 1980. La M_{50} representa la edad en la que ha sobrevivido el 50% de los individuos de cada población. (Según Arking 1998.)

Tiempo máximo de vida y expectativa de vida

El **tiempo máximo de vida** es una característica de una especie; éste es el número máximo de años que se sabe que sobrevive un miembro de una especie. El tiempo máximo de vida humana se estima que es de 121 años (Arking 1998). Los tiempos máximos de vida de las tortugas y de las truchas de lago son desconocidos, pero se han estimado en más de 150 años.* El tiempo máximo de vida de un perro doméstico es cerca de 20 años y el de un ratón de laboratorio es de 4,5 años. Si una mosca de la fruta *Drosophila* sobrevive a la eclosión (en la salvaje, cerca del 90% muere como larva), tiene un tiempo máximo de vida de 3 meses.

Sin embargo, no se puede esperar que una persona viva 121 años y la mayoría de los ratones en la vida salvaje no vive para celebrar su primer cumpleaños. La **expectativa de vida**, el tiempo que puede esperarse que viva un individuo de una determinada especie, no es una característica de la especie, sino de las poblaciones. Esto es definido frecuentemente como la edad en la que la mitad de la población todavía sobrevive. Un bebe nacido en Inglaterra en 1780 podía esperarse que viviera 35 años. En Massachussets durante el mismo tiempo, la expectativa de vida era de 28 años. Éste fue el rango normal de la expectativa de vida humana para la mayor parte del género humano en la mayoría de las épocas. Incluso actualmente, en algunas áreas del mundo (Camboya, Togo, Afganistán y otros países) la expectativa de vida es de menos de 40 años. En los Estados Unidos, una persona nacida en 1986 puede esperar vivir alrededor de 70 años si es hombre y 80 años si es mujer.*

Debido a que en la mayoría de las épocas y lugares, el ser humano no vivió mucho más de los 40 años, nuestra conciencia de envejecimiento es relativamente nueva. Una persona de 65 años de edad era poco frecuente en la América colonial, pero en la actualidad es algo común. Algunas curvas de supervivencia para la mujer *Homo sapiens* en los Estados Unidos están graficadas en la figura 18-32. En 1900, el 50% de las mujeres norteamericanas moría a la edad de 58 años. En 1980, el 50% de las mujeres moría a los 81 años de edad. Por lo tanto, el fenómeno de senescencia y de enfermedades del envejecimiento es mucho más frecuente actualmente que hace un siglo. En 1900, la gente no tenía el "lujo" de morir de ataques cardíacos o de cáncer, debido a que es más probable que estas enfermedades se produzcan en las personas mayores de 50 años. En su lugar, la gente moría (como todavía sucede en muchos lugares del mundo) de enfermedades infecciosas y parásitos (Arking 1998). De modo semejante, hasta hace poco, relativamente poca gente exhibía el fenotipo senescente humano más general: cabello canoso, piel caída y arrugada, articulaciones rígidas, osteoporosis (pérdida de calcio óseo), pérdida de fibras musculares y de fuerza muscular, pérdida de la me-

* Algunas tortugas no solamente podrían vivir mucho tiempo, sino que ellas también podrían escapar a la senescencia. Millar (2001) ha demostrado que incluso las capacidades reproductivas de las cajas de tortugas de tres dedos no están afectadas y que una tortuga hembra de 60 años de edad pone tantos huevos como anualmente acostumbraba a hacerlo.

* Se puede ver por qué la financiación de la seguridad social es problemática en Estados Unidos. Cuando fue creada en 1935, el trabajador extranjero promedio moría antes de los 65 años. Por lo tanto, no se esperaba que él (y éste frecuentemente era un él) retornara al sistema para el que había pagado. Del mismo modo, el casamiento "hasta que la muerte los separe" era una fácil proeza cuando la muerte ocurría en la tercera o cuarta década de la vida. El promedio de muerte de la mujer joven debido a infecciones asociadas con el parto fue alto en todo el mundo antes de los antibióticos.

moria, deterioro de la visión y el enlentecimiento de la respuesta sexual. Como el melancólico Jacques observó en *Como tú lo quieres* de Shakespeare, los que sobreviven a la senescencia dejan el mundo "sin dientes, sin ojos, sin gusto, sin todo".

Causas de envejecimiento

El fenotipo senescente general es característico de cada especie. Pero, ¿qué lo causa? Esta pregunta puede ser respondida a muchos niveles. Aquí, se mirará primariamente al nivel de organización celular. Mientras que todavía no hay un consenso sobre qué causa el envejecimiento (aun a nivel celular), una teoría que está emergiendo incluye estrés oxidativo, hormonas y daño al DNA.

USO Y DESGASTE GENERAL E INESTABILIDAD GENÉTICA. Las teorías de envejecimiento de "uso y desgaste" están entre las hipótesis más antiguas propuestas para explicar el fenotipo senescente humano (Weismann 1891; Szilard 1959). A medida que uno envejece, se acumulan pequeños traumas en el cuerpo y el genoma. A nivel molecular, las mutaciones puntuales incrementan el número y las eficiencias de las enzimas codificadas por nuestros genes disminuyen. Si las mutaciones se producen en una parte del aparato de síntesis de proteína, la célula produce un gran porcentaje de proteínas defectuosas (Orgel 1963). Si las mutaciones fueran originadas en las enzimas que sintetizan el DNA, se debería esperar que el promedio general de mutaciones en el organismo se incrementase marcadamente; Murray y Holliday (1981) han documentado tal defecto de las DNA polimerasas en las células senescentes.

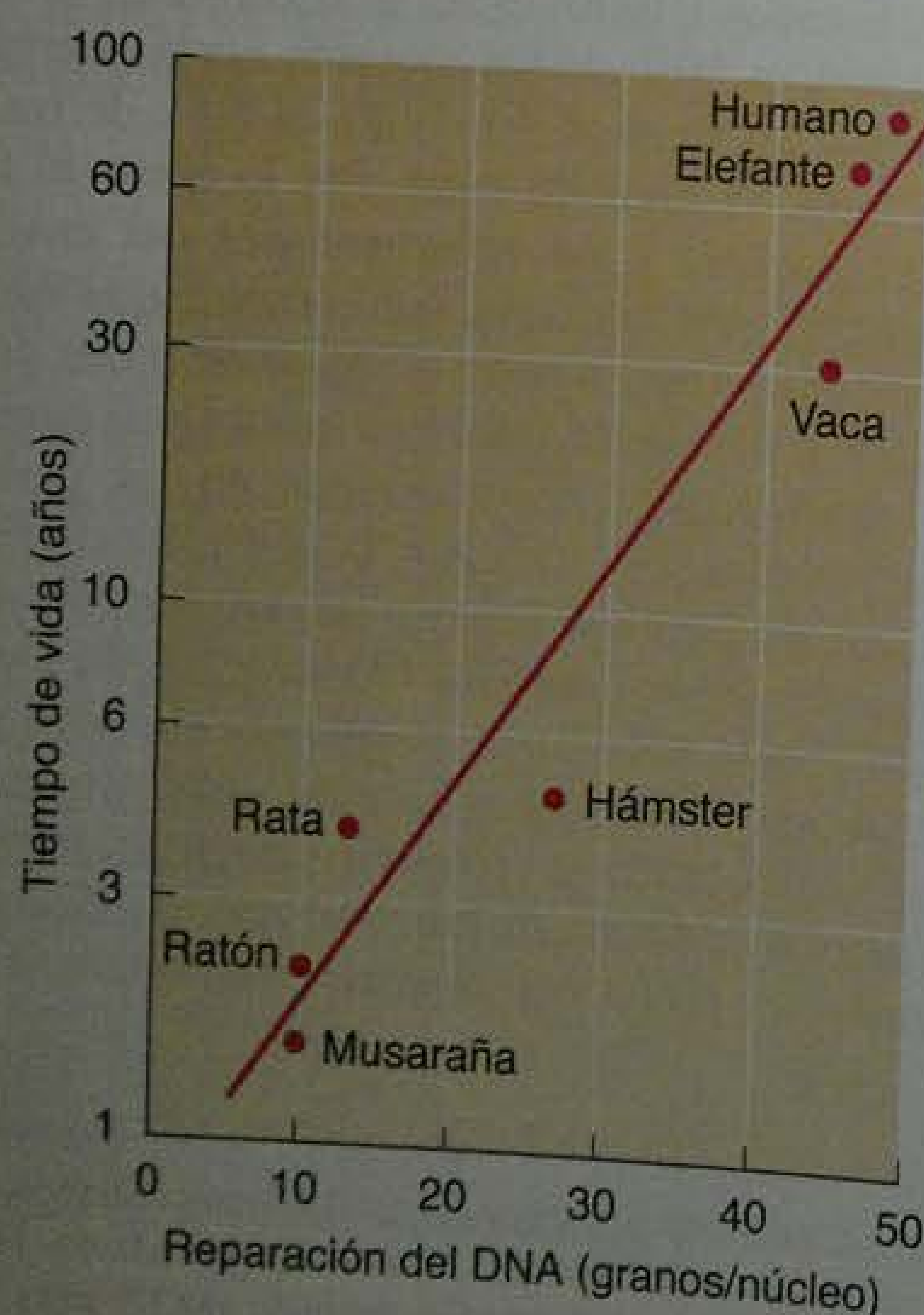


Fig. 18-33. Correlación entre el tiempo de vida y la capacidad de los fibroblastos de varias especies de mamíferos para reparar DNA. La capacidad para reparar es representada en autorradiografía por el número de granos de timidina radiactiva por núcleo celular. Obsérvese que el eje *y* (tiempo de vida) es una escala logarítmica. (Según Hart y Setlow 1974.)

Del mismo modo, la reparación del DNA puede ser importante en impedir la senescencia. Ciertos síndromes de envejecimiento prematuro en el humano parecen ser causados por mutaciones en tales enzimas de reparación del DNA (Sun y col. 1998; Shen y Loeb 2001). Los individuos de especies cuyas células tienen enzimas de reparación de DNA más eficaces viven más tiempo (fig. 18-33; Hart y Setlow 1974).

DAÑO OXIDATIVO. Una de las principales teorías ve al metabolismo como la causa del envejecimiento. De acuerdo con esta teoría, el envejecimiento es el resultado del metabolismo normal, que produce, como subproducto, **especies reactivas del oxígeno (ERO)**. Estas ERO pueden oxidar y dañar las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos. Algunos de los 2 a 3% de los átomos de oxígeno tomados por las mitocondrias son reducidos insuficientemente y forman un grupo de ERO: iones superóxido, radicales hidróxido y peróxido de hidrógeno. La evidencia de que las ERO son críticas en el proceso de envejecimiento incluye la observación de que las *Drosophilas* que sobreexpresan enzimas que destruyen ERO (catalasa, que degrada peróxido y superóxido dismutasa) viven 30-40% más que las moscas control (Orr y Sohal 1994; Parkes y col. 1998; Sunand Tower 1999).

Además, las moscas con mutaciones en el gen *methuselah* (Matusalén) (nombrado después de que el sujeto bíblico dijo haber vivido 969 años) viven un 35% más que las moscas tipo salvaje. Los mutantes *methusaleh* han aumentado la resistencia al paraquat, un veneno que funciona mediante la generación de ERO dentro de las células (Lin y col. 1998). Estos hallazgos no solo sugieren que el envejecimiento está bajo control genético, sino que además proporciona evidencia para el papel del ERO en el proceso de envejecimiento. En *C. elegans*, también, los individuos con mutaciones que resultan en la degradación de ERO o que evitan la formación de ERO viven mucho más tiempo que los nematodos tipo salvaje (Larsen 1993; Vanfleteren y De Vreese 1996; Feng y col. 2001).

La evidencia de que las ERO están involucradas en el envejecimiento de mamíferos no es demasiado clara. Las mutaciones en ratones que generan la carencia de ciertas enzimas que degradan ERO no provocan envejecimiento prematuro (Ho y col. 1997; Melov y col. 1998). Sin embargo, puede haber más redundancia genética en mamíferos que en invertebrados y otros genes pueden ser regulados en más para producir enzimas de degradación relacionadas a ERO. La hipótesis del daño oxidativo no contradice necesariamente la hipótesis de "uso y desgaste". En su lugar, proporciona un mecanismo específico que puede proporcionar un importante estrés que se acumula a medida que el organismo madura.

DAÑO DEL GENOMA MITOCONDRIAL. El índice de mutación en la mitocondria es de 10-20 veces del índice de mutación del DNA nuclear (Johnson y col. 1999). Se piensa que las mutaciones en la mitocondria pueden: 1) conducir a defectos en la producción de energía, 2) llevar a la producción de ERO mediante defectos en el transporte de electrones y 3) inducir apoptosis. La declinación dependiente de la edad en la función mitocondrial es observada en muchos mamíferos, incluso en seres humanos (Boffoli y col. 1994). Un informe reciente (Michikawa y

col. 1999) demuestra que hay "puntos calientes" en el genoma mitocondrial para las mutaciones relacionadas con la edad y que las mitocondrias con estas mutaciones tienen una frecuencia de replicación más elevada que la de la mitocondria tipo salvaje. Por lo tanto, las mutantes son capaces de dejar fuera de competencia a las mitocondrias tipo salvaje y finalmente dominar la célula y su progenie. Además, las mutaciones pueden no solo permitir que sea producido más ERO, sino que además pueden hacer al DNA mitocondrial más susceptible al daño mediado por ERO.

LAS MUTACIONES PROVOCAN SÍNDROMES DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO. Se ha demostrado que varios genes afectan el envejecimiento. En los seres humanos, el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford provoca que los niños envejezcan rápidamente y mueran (en general de falla cardíaca) tan pronto como a los 12 años de edad (fig. 18-34). Ésta es causada por un gen mutante dominante, y los síntomas incluyen piel delgada con manchas de la edad, masa ósea reabsorbida, caída del cabello y arteriosclerosis; todas características del fenotipo senescente humano. Un síndrome similar es causado por las mutaciones del gen *klotho* en ratones (Kuro-o y col. 1997). Las funciones de los productos de estos genes no son conocidas, pero se piensa que están involucradas en la supresión de los fenotipos de envejecimiento. Estas proteínas pueden ser extremadamente importantes en la determinación del ritmo de la senescencia.*

Envejecimiento programado de manera genética

Uno de las críticas a la idea de "programas" genéticos para el envejecimiento cuestiona cómo lo pudo haber seleccionado la evolución. Una vez que el organismo ha pasado la madurez y criado a sus descendientes, éste es "una excrecencia" sobre el árbol de la vida (Rostand 1962); la selección natural presumiblemente no puede actuar sobre características que afectan a un organismo únicamente *después* de que éste se ha reproducido. Pero, "¿cómo puede la evolución seleccionar por un camino para la degeneración?" puede ser una pregunta errónea. La evolución probablemente no puede seleccionar para tales características. La pregunta correcta podría ser, "¿cómo puede la evolución seleccionar para fenotipos que postergan la reproducción o la madurez sexual?" Hay, frecuentemente, un equilibrio entre la reproducción y el mantenimiento, y en muchas especies la reproducción y la senescencia están estrechamente relacionadas.

* Hay una proposición popular de que el acortamiento de los telómeros –secuencias de DNA repetidas en los extremos de los cromosomas– es responsable de la senescencia. El acortamiento de los telómeros ha sido conectado con una capacidad disminuida de las células para dividirse. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación entre la longitud del telómero y la duración de la vida de un animal (los seres humanos tienen telómeros más cortos que los ratones), ni tampoco hay correlación entre la longitud del telómero humano y la edad de una persona (Cristofalo y col. 1998; Rudolph y col. 1999; Karlseder y col. 2002). Se ha sugerido que la inhibición de la división celular dependiente del telómero podría servir primariamente como una defensa contra el cáncer en lugar de un "reloj de envejecimiento".



Fig. 18-34. Niños con progeria. Aunque todavía no tienen 8 años de edad, el niño sobre la derecha tiene un fenotipo similar al de una persona anciana. La ausencia de pelo, la distribución de la grasa y la transparencia de la piel son características del patrón de envejecimiento humano normal visto en los adultos mayores de edad. (Fotografía © Associated Press.)

Estudios recientes de *C. elegans* y de *Drosophila* sugieren que *hay* una vía genética conservada que regula el envejecimiento, y que ésta puede ser seleccionada durante la evolución. Esta vía podría ser responsable de poner a estos organismos en un tipo de animación suspendida durante períodos de condiciones ambientales adversas. Aquí, el mantenimiento prevalece sobre la reproducción. Este estado se denomina **diapausa** y numerosos organismos presentan esta condición. Una larva de *C. elegans* recién nacida continúa a través de cuatro estadios, después de los cuales puede convertirse en un adulto; o, si los nematodos están superpoblados o si hay alimentación insuficiente, la larva puede entrar en un estado sin alimentación, estadio de **larva dauer** metabólicamente latente. Esta larva dauer es la condición diapausa de *C. elegans*, no se alimenta y es resistente al estrés oxidativo. El nematodo se puede mantener en este estado de diapausa por más de 6 meses, en lugar de llegar a ser un adulto que vive solamente unas pocas semanas. En este estado dauer, el nematodo ha incrementado la resistencia a ERO y cuando sale de este estadio, vivirá tanto tiempo como si nunca hubiera sido una larva dauer. Si algunos de los genes en la vía que conducen a la formación de la larva dauer están mutados, se permite el desarrollo del adulto, pero la resistencia a ERO todavía se conserva. Los adultos resultantes viven dos a cuatro veces más tiempo que los adultos tipo salvaje (fig. 18-35; Friedman y Johnson 1988).

La vía que regula la formación de la larva dauer y la longevidad ha sido identificada como la vía de señalización de la insulina (Guarente y Kenyon 2000; Gerish y col. 2001). Ambientes favorables llevan a la activación del homólogo del receptor de insulina DAF2, y este receptor estimula el comienzo de la edad adulta. Los ambientes pobres no activan al receptor DAF2 y la formación de dauer continúa. Mientras que alelos con grave pérdida de función en esta vía causan la formación de la larva de dauer en cualquier ambiente, las mutaciones dé-

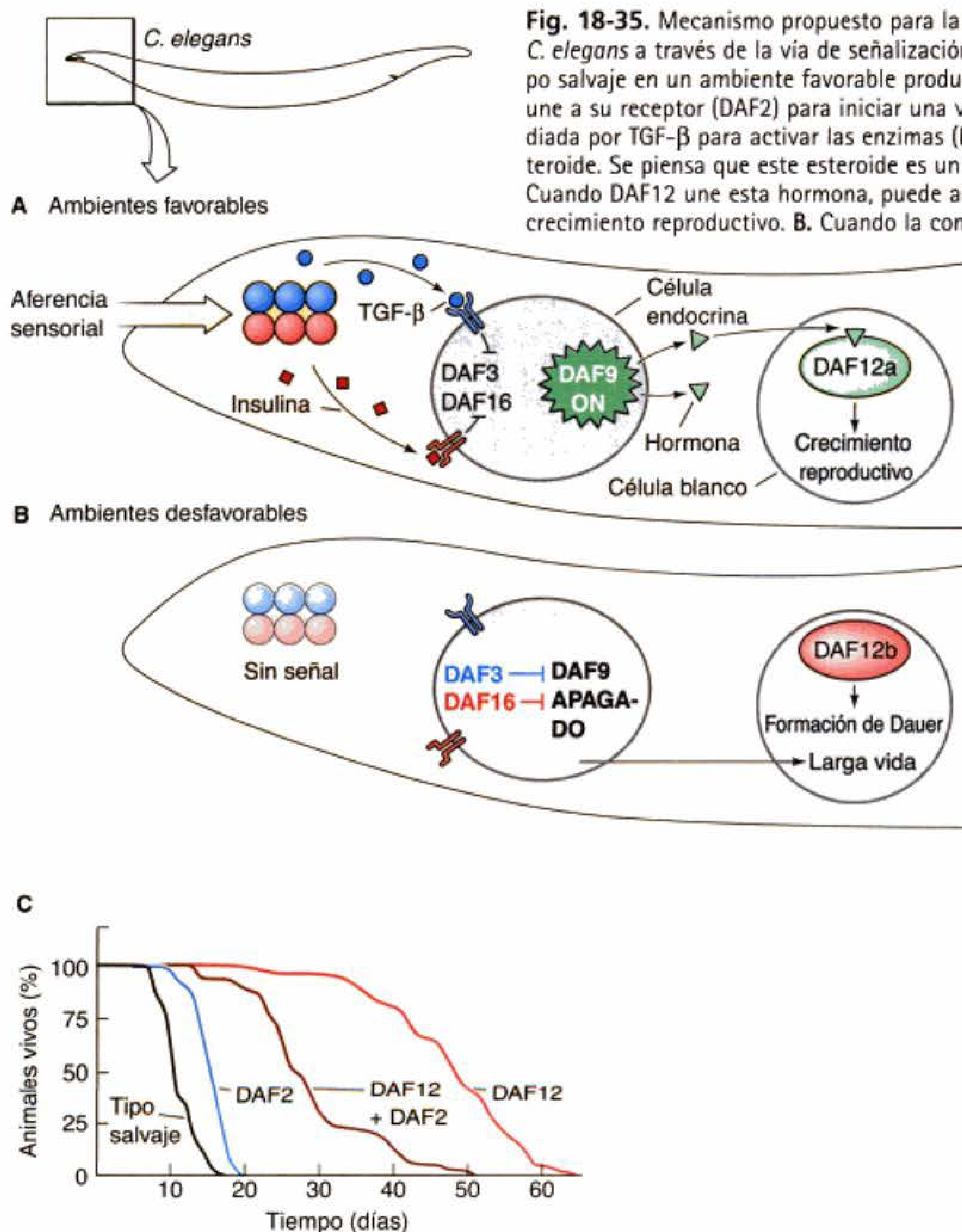


Fig. 18-35. Mecanismo propuesto para la extensión de la duración de la vida de *C. elegans* a través de la vía de señalización de la insulina. **A.** Los nematodos tipo salvaje en un ambiente favorable producen una proteína tipo insulina que se une a su receptor (DAF2) para iniciar una vía que interactúa con una señal mediada por TGF-β para activar las enzimas (DAF9) que sintetizan una hormona esteroide. Se piensa que este esteroide es un ligando para la proteína DAF12. Cuando DAF12 une esta hormona, puede activar a los genes responsables del crecimiento reproductivo. **B.** Cuando la comida no está disponible, no se da la señal de insulina, no se produce la hormona esteroide y la proteína DAF12 actúa como un inhibidor de los genes que ésta debería haber activado habiendo unido la hormona; en esta situación, DAF12 activa a los genes involucrados en la formación de la larva dauer. **C.** Gráfico que muestra el incremento en la longevidad de los mutantes *daf2.* Mientras que los mutantes de DAF12 (factor de transcripción que une esteroides) viven ligeramente menos tiempo que el tipo salvaje, las mutantes DAF2 (receptor de insulina) viven el doble de tiempo que el tipo salvaje. Los gusanos con ambos juegos de mutaciones viven cuatro veces más tiempo que los gusanos de tipo salvaje. (Según Gerisch y col. 2001.)

biles en la vía de señalización de la insulina les permiten a los animales alcanzar la edad adulta y vivir más tiempo que los animales tipo salvaje.

La regulación en menos de esta vía de señalización de la insulina también tiene otras funciones. En primer lugar, parece influir en la disminución del metabolismo, al disminuir el transporte mitocondrial de electrones. Cuando el receptor DAF2 no es activo, los organismos han disminuido la sensibilidad al ERO (Feng y col. 2001; Scott y col. 2002). En segundo lugar, éste incrementa la producción de enzimas que evitan el daño oxidativo, así como las enzimas que reparan el DNA (Honda y Honda 1999; Tran y col. 2002). En tercer lugar, ésta disminuye la fertilidad (Gems y col. 1998). Desde un punto de vista clásico, la vía de la insulina puede mediar un intercambio entre la reproducción y la supervivencia/mantenimiento. De modo interesante, muchos de los efectos adversos de señalización reducida de insulina (es decir, fertilidad y metabolismo reducidos) no son aparentes en individuos con las mutaciones débiles de *daf2* que son también de larga vida. Este hallazgo sugiere que la longevidad puede estar desacoplada de la infertilidad.

Otra señal de longevidad que puede actuar independientemente de la vía de señalización de la insulina, se origina en la gónada. Cuando las células de la línea germinal son eliminadas del *C. elegans*, los animales viven más tiempo. Se piensa que las células madre de la línea geminal producen una sustancia que bloquea los efectos de la hormona esteroidea inductora de la longevidad (Hsin y Kenyon 1999; Gerisch y col. 2001; Arantes-Oliviera 2002).

La vía de señalización de la insulina también parece regular la duración de la vida en *Drosophila* y las moscas con mutaciones débiles de pérdida de función del gen del receptor de insulina viven casi un 85% más que las moscas tipo salvaje (Clancy y col. 2001; Tatar y col. 2001). Estos mutantes de larga vida son estériles y su metabolismo se asemeja al de las moscas que están en diapausa (Kenyon 2001). Es posible que el sistema también opere en los mamíferos, pero la insulina de mamíferos y las vías del factor de crecimiento tipo insulina están demasiado integradas con el desarrollo embrionario y en el metabolismo del adulto de modo tal que las mutaciones frecuentemente tienen numerosos efectos perjudiciales (como

diabetes o el síndrome de Donahue). Sin embargo, hay alguna evidencia de que la vía de señalización de la insulina afecta el tiempo de vida en mamíferos. En primer lugar, los ratones con mutaciones de pérdida de función de la vía de señalización de la insulina viven más tiempo que su compañeras de camada tipo salvaje (véase Partridge y Gems 2002). En segundo lugar, las crías de perros con bajos niveles del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1) viven más tiempo que las crías con altos niveles de este factor. En tercer lugar, los ratones que carecen de una copia del gen del receptor IGF1 viven cerca de un 25% más tiempo que los ratones tipo salvaje (y tienen una resistencia más elevada a ERO pero una fisiología y fertilidad de otro modo normal). Y finalmente, la restricción calórica –una de las pocas vías conocidas incrementa la longevidad en mamíferos (otra vez, a expensas de la fertilidad)– puede extender la vida mediante la reducción de los niveles de insulina circulante y de IGF1 (Kenyon 2001; Roth y col. 2002; Holzenberger y col. 2003).

Pero dentro de la red genética, el azar juega un papel importante. Aun en *C. elegans*, el envejecimiento no es un fenómeno totalmente regulado por genes. Dentro de nematodos clonalmente idénticos alimentado con una dieta idéntica, algunos organismos viven más tiempo que otros y distintos órganos se deterioran más rápidamente en los diferentes individuos (Herndon y col. 2002).

A medida que la expectativa de vida humana se incrementa debido a los avances en nuestra capacidad para evitar y curar enfermedades, todavía estamos con un síndrome de envejecimiento general que es característico de nuestra especie. A menos que se preste atención a este síndrome de envejecimiento general, se corre el riesgo de terminar como Tithonios, el miserable desdichado de la mitología griega a quien los dioses premiaron con la vida eterna, pero no con la eterna juventud. Sin embargo, nuestro nuevo conocimiento de regeneración está poniéndose en uso por la medicina, y muy pronto podremos ser capaces de mejorar algunos de los síntomas del envejecimiento. Esta interacción de la biología del desarrollo y la medicina puede tener consecuencias de largo alcance y será discutida en el capítulo 21.

Resumen: metamorfosis, regeneración y envejecimiento

1. La metamorfosis de los anfibios incluye cambios morfológicos y bioquímicos. Algunas estructuras se remodelan, algunas se reemplazan y se forman algunas estructuras nuevas.
2. La hormona responsable de la metamorfosis de los anfibios es la triyodotironina (T_3). La síntesis de T_3 desde la tiroxina y la degradación de T_3 por deyodinasas puede regular la metamorfosis en diferentes tejidos. T_3 se une a los receptores de hormonas tiroideas y actúa predominantemente a nivel transcripcional.
3. Muchos cambios durante la metamorfosis son regionalmente específicos. Los músculos de la cola degeneran; los músculos del tronco persisten. Un ojo persistirá incluso si es trasplantado hacia una cola en degeneración.
4. La heterocronía involucra cambios en las velocidades relativas de desarrollo de las diferentes partes del animal. En la neotenia, la forma larval está conservada mientras que las gónadas y las células germinales maduran a su velocidad normal. En la progénesis, las gónadas y las células germinales maduran rápidamente mientras que el resto del cuerpo madura normalmente. En ambos ejemplos, el animal puede aparearse mientras conserva su forma larval o juvenil.
5. En animales con desarrollo directo, el estadio larval ha sido perdido. Algunas ranas, por ejemplo, forman extremidades mientras están en el huevo.
6. Los insectos ametábolos experimentan desarrollo directo. Los insectos hemimetábolos pasan a través de estadios de ninfa por los cuales el organismo inmaduro es frecuentemente una versión más pequeña del adulto.
7. En los insectos holometábolos, hay una metamorfosis espectacular desde larva a pupa hacia un adulto sexualmente maduro. En los estadios entre mudas larvales, la larva es denominada un instar. Después del último instar, la larva experimenta una muda metamórfica para convertirse en una pupa. La pupa experimenta una muda imaginal para llegar a ser un adulto.
8. Durante el estadio pupal, crecen los discos imaginales e histoblásticos y se diferencian para producir las estructuras de cuerpo del adulto.
9. Los ejes anteroposterior, dorsoventral y proximal-distal son especificados secuencialmente mediante interacciones entre los diferentes compartimentos en los discos imaginales. El disco se "telescopa hacia afuera" durante el desarrollo, sus regiones centrales se vuelven más distales.
10. La muda es causada por la hormona 20-hidroxiecdisona (20E). Ante la presencia de elevados niveles de hormona juvenil, la muda da origen a otro estadio larval (instar). En bajas concentraciones de hormona juvenil, la muda produce una pupa; si la hormona juvenil no está presente, la muda es una muda imaginal.
11. El gen del receptor de ecdisona produce un RNA nuclear que puede formar al menos tres proteínas diferentes. Los tipos de receptores de ecdisona en una célula pueden influenciar la respuesta de esta célula a la 20E. Los receptores de ecdisona se unen al DNA para activar o reprimir la transcripción.
12. Hay tres tipos principales de regeneración. En la epimorfosis (tal como la regeneración de las extremidades), los tejidos se desdiferencian hacia un blastema de regeneración, se dividen y se vuelven a diferenciar hacia la nueva estructura. En la morfalaxis (característica de la hidra), hay un reestablecimiento del patrón del tejido existente mientras que crece muy poco o no lo hace. En la regeneración compensatoria (tal como en el hígado), las células se dividen pero no conservan su estado diferenciado.

13. En la extremidad en regeneración de la salamandra, la epidermis forma un *capuchón* apical ectodérmico. Las células por debajo de éste se desdiferencian para formar un blastema. Las células desdiferenciadas pierden sus adhesiones y vuelven a ingresar al ciclo celular. FGF10 y los factores desde las neuronas parecen ser críticos en permitir que se produzca la regeneración.
14. La regeneración de la extremidad de la salamandra parece utilizar el mismo sistema de formación de patrón como el de la extremidad en desarrollo.
15. En *Hydra*, parece haber un gradiente de activación de la cabeza, un gradiente de inhibición de la cabeza, un gradiente de activación del pie y un gradiente de inhibición del pie. Las gemaciones se producen donde estos gradientes son mínimos.
16. La región del hipostoma de *Hydra* parece ser una región organizadora que secreta factores paracrinos para alterar los destinos del tejido que lo rodea.
17. El tiempo máximo de vida de una especie es el tiempo mayor que se ha observado que sobrevive un individuo de una especie. La expectativa de vida es la edad a la que aproximadamente el 50% de los miembros de una población determinada todavía sobrevive.
18. El envejecimiento es el deterioro relacionado con el tiempo de las funciones fisiológicas necesarias para la supervivencia y la reproducción. Los cambios fenotípicos de la senescencia (que afectan a todos los miembros de una especie) no deben ser confundidos con enfermedades de la senescencia, como cáncer y enfermedad cardíaca (que afecta a algunos individuos pero no a otros).
19. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) pueden dañar las membranas celulares, inactivar proteínas y mutar el DNA. Las mutaciones que alteran la capacidad para producir o degradar ERO pueden cambiar la duración de la vida.
20. La mitocondria puede ser un blanco para las proteínas que regulan el envejecimiento.
21. Una vía de señalización de la insulina, que involucra a un receptor para insulina y a proteínas tipo insulina, puede ser un componente importante de la duración de la vida limitada genéticamente.

Bibliografía citada

Abu-Shaar, M. and R. S. Mann. 1998. Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during Drosophila leg development. Development 125: 3821-3830.

Alberch, P. and J. Alberch. 1981. Heterochronic mechanisms of morphological diversification and evolutionary change in the neotropical salamander Bolitoglossa occidentalis (Amphibia: Plethodontidae). J. Morphol. 167: 249-264.

Allen, B. M. 1916. Extirpation experiments in Rana pipiens larva. Science 44: 755-757.

Alley, K. E. and M. D. Barnes.1983. Birthdates of trigeminal motor neurons and metamorphic reorganization of the jaw myoneural system in frogs. J. Comp: Neurol. 218: 395-405.

Altizer, A. M., S. G. Stewart, B. K. Albertson and R. B. Borgens. 2002. Skin flaps inhibit both the current of injury at the amputation surface and regeneration of that limb in newts.J. Exp. Zool. 293: 467-477.

Arantes-Oliviera, N., J. Apfeld, A. Dillin and C. Kenyon. 2002. Regulation of lifespan by germline stem cells in Caenorhabditis elegans. Science 285: 502-505.

Arking, R. 1998. The Biology of Aging, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Ashburner, M. 1972. Patterns of puffing activity in the salivary glands of Drosophila. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of D. melanogaster cultured in vitro. Chromosoma 38: 255-281.

Ashburner, M. 1974. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. II. Effects of inhibitors of protein synthesis. Dev. Biol. 39: 141-157.

Ashburner, M. 1990. Puffs, genes, and hormones revisited. Cell 61: 1-3.

Ashburner, M. and H. D. Berondes. 1978. Puffing of polytene chromosomes. In the Genetics and Biology of Drosophila, Vol. 2B. Academic Press, New York, pp. 316-395.

Atkinson, B. G., C. Helbing and Y. Chen. 1996. Reprogramming of genes expressed in amphibian liver during metamorphosis. In L. I. Gilbert, B. G. Atkinson and J. R. Tata (eds.), Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells. Academic Press. San Diego, pp. 539-566.

Becker, K. B., K. C. Stephens, J. C. Davey, M. J. Sdmeider and V. A. Galton. 1997. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in Rana catesbeiana tadpoles. Endocrinology 138: 2989-2997.

Berry, D. L., C. S. Rose, B. F. Remo and D. D. Brown. 1998. The expression pattern of thyroid hormone response genes in remodeling tadpole tissues defines distinct growth and resorption gene expression patterns. Dev. Biol. 203: 24-35.

Blair, S. S. 1993. Mechanisms of compartment formation: Evidénce that nonproliferating cells do not play a role in defining the D/V lineage restriction in the developing wing of Drosophila. Development 119: 339-351.

Bode, P. M. and H. R Bode. 1984. Patterning in Hydra. In G. M. Malacinski and S. V. Bryant (eds.), Pattern Formation. Macmillan, New York, pp. 213-241.

Boffoli, D., S. C. Sacco, R. Vergari, G. Solarino, G. Santacroce and S. Papa. 1994. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 1226: 73-86.

Braun, M. and H. R. Bode. 2002. Characterization of the head organizer in hydra. Development 129: 875-884.

Braun, M., S. Sokol and H. R. Bode.1999. Cngsc, a homologue of goosecoid, participates in the patterning of the head and is expressed in the organizer region of Hydra. Development 126: 5245-5254.

Brenner, S. 1996. Francisco Crick in Paradiso. Curr. Biol. 6: 1202.

Bridge, D. M., N. A. Stover and R. E. Steele. 2000. Expression of a novel receptor tyrosine kinase gene and a paired-like homeobox gene provides evidence of differences in patterning at the oral and aboral ends of hydra. Dev. Biol. 220: 253-262.

Brockes, J. P. 1992. Introduction of a retinoid reporter gene into the urodele limb blastema. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11386-11390.

Brockes, J. P. and C. R. Kinter.1986. Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of urodele amphibians. Cell 45: 301-306.

Brockes, J. P. and A. Kumar. 2002. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 566-574.

Browne, E. N. 1909. The production of small hydranths in hydra by insertion of small grafts. J. Exp. Zool. 7: 1-23.

Brust, D. G. 1993. Maternal brood care by Dendrobates pumilio: A fro that feeds its youn. J. Herpetol. 26: 102-105.

Bryant, S. 1999. A regeneration renaissance, Semin. Cell. Dev. Biol. 10:313.

Bryant, S. V. and D. M. Gardiner. 1992. Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. Dev. Biol. 152: 1-25.

Butenandt, A. and P. Karlson. 1954. Über die Isolierung eines Metamorphosen-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. Z Naturforsch. B 9: 389-391.

Butler, E. G. 1935. Studies on limb regeneration in X-rayed Ambystoma larvae. Anat. Rec. 62: 295-307.

Callery. E. M., H. Fang and R. P. Elinson. 2001. Frogs without polliwogs: Evolution of anuran direct development. BioEssays 23: 233-241.

Campbell, R. D. 1967a. Tissue dynamics of steady state growth in Hydra littoralis. I. Patterns of cell division. Dev. Biol. 13: 487-502.

Campbell, R. D. 1967b. Tissue dynamics of steady state growth in Hydra littoralis. II. Patterns of tissue movement. J. Morphol. 1: 19-28.

Causo, J. P., M. Bate and A. Martinez-Arias. 1993. A wingless-dependent polar coordinate system in Drosophila imaginal discs. Science 259: 484-489.

Chernoff, E. A. G. and D. Stocum. 1995. Developmental aspects of spinal cord and limb regeneration. Dev. Growth Diff: 37: 133-147.

Clancy, D. J., D. Gems, L. G. Harshman, S. Old-ham, H. Stocker, E. Hafen, S. J. Leevers and L.Partridge. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. Science 292: 104-106.

Clever, U. 1966. Induction and repression of a puff in Chironomus tentans. Dev. Biol. 14: 421-438.

Cohen, P. P. 1970. Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. Science 168: 533-543.

Condic, M. L., D. Fristrom and J. W. Fristrom. 1990. Apical cell shape changes during Drosophila imaginal leg disc elongation: A novel morphogenetic mechanism. Development 111: 23-33.

Corben, C. J., M. J. Ingram and M. J. Tyler. 1974. Gastric brooding: Unique form of parental care in an Australian frog. Science 186: 946-947.

Crawford, K. and D. L. Stocum. 1988a. Retinoic acid coordinately proximalizes regenerate pattern and blastema differential affinity in axolotl limbs. Development 102: 687-698.

Crawford, K. and D. L. Stocum. 1988b. Retinoic acid proximalizes level-specific properties responsible for intercalary regeneration in axolotl limbs. Development 104: 703-712.

Cristofalo, V. J., R. G. Allen, R. J. Pignolo, B. G. Martin and J. C. Beck. 1998. Relationship between donor age and relicative life span of human cells in culture: A reevaluation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10614-10619.

Crossgrove, K., C. A. Bayer, J.W. Fristrom and G. M. Guild, 1996. The Drosophila Broad Complex early gene directly regulates late gene trangeneration during the ecdysone-induced puffing cascade. Dev. Biol. 180: 745-758.

Currie, J. and W. M. Cowan. 1974. Evidence for the late development of the uncrossed retinothalamic projections in the frog Rana pipiens. Brain Res. 71: 133-139.

De Beer, G. 1940. Embryos and Ancestors. Clarendon Press, Oxford.

Dedkov, E. I., Y. Y. Kostrominova, A. B. Borisov and B. M. Carlson. 2001. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscle of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. Anat. Rec. 263: 139-154.

del Pino, E. M. and R. P. Elinson. 1983. A novel development pattern for frogs: Gastrulation produces an embryonic disk. Nature 306: 589-591.

Denver, R. 1993. Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing factor-like peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 91: 38-51.

Denver, R.2003. The vertebrate neuroendocrine stress system and its role in orchestrating life history transitions. Society for Integrative and Comparative Biology, Annual Meeting. http://www-.sicb.org/meetings/2003/schedule/a bstractdetails.php3?id=39.

Diaz-Benjumea, E. J. and S. M. Cohen. 1993. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila. Cell 75: 741-752.

Dinsmore, C. E. (ed.) 1991. A History of Regeneration Research: Milestones in the Evolution of a Science. Cambridge University Press, New York.

Eliceiri, B. P. and D. D. Brown. 1994. Quantitation of endogenous thyroid hormone receptors alpha and beta during embryogenesis and metamorphosis in Xenopus laevis. J. Biol. Chem. 269: 24459-24465.

Elinson, R. P. 1987. Change in developmental patterns: Embryos of amphibians with large eggs. In R. A. Raff and E. C. Raff (eds.), Development as an Evolutionary Process. Alan R. Liss, New York, pp. 1-21.

Emery, J. F., V. Bedian and G. M. Guild. 1994. Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during Drosophila metamorphosis. Development 120: 3275-3287.

Fallon, J. F. and B. K. Simandl. 1978. Evidence of a role for cell death in the disappearance of the embryonic human tail. Am. J. Anat. 152: 111-130.

Feng, J., F. Bussiee and S. Hekimi. 2001. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in Caenorhabditis elegans. Dev. Cell 1: 633-644.

Frieden, E. 1981. The dual role of thyroid hormones in vertebrate development and calorigenesis. In L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology. Plenum, New York, pp. 545-564.

Hoskins, S. G. and P. Grobstein. 1985b. Development of the ipsilateral retinothalamic projection in the frog Xenopus laevis. III. The rale of thyroxine. J. Neurosci. 5: 930-940.

Hsin, H. and C. Kenyon. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans. Nature 399: 362-365.

Huang, H., N. Marsh-Armstrong and D. D. Brown. 1999. Metamorphosis is inhibited in transgenic Xenopus laevis tadpoles that overexpress type III deiodinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 962-967.

Huang, H., L. Cai, B. F. Remo and D. D. Brown. 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in Xenopus laevis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7348-7353.

Huxley, J. 1920. Metamorphosis of axolotl caused by thyroid feeding. Nature 104: 436.

Imokawa, Y. and K. Yoshizato. 1997. Expression of sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastema recapitulates that in developing limb buds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9159-9164.

Ishizuya-Oka, A., S. Ueda, T. Amano, K. Shimizu, K. Suzuki, N. Ueno and K. Yoshizato. 2001. Thyroid-hormone-dependent and fibroblast-specific expression of BMP-4 correlates with adult epithelial development during amphibian intestinal remodeling. Cell Tissue Res. 303: 187-195.

Jiang, C., A. F. Lamblin, H. Steller and C. S. Thummel. 2000. A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during Drosophila metamorphosis. Mol. Cell 5: 445-455.

Johnson, F. B., D. A. Sinclair and L. Guarente. 1999. Molecular biology of aging. Cell 96: 291-302.

Jones, G., M. Wozniak, Y. Chu, S. Dhar and D. Jones. 2001. Juvenile hormone-III-dependent conformational changes of the nuclear receptor Ultraspiracle. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 33-39.

Kalm, L. von, D. Fristrom and J. Fristrom. 1995. The making of a fly leg: A model for epithelial morphogenesis. BioEssays 17: 693-702.

Kaltenbach, J. C., A. E. Fry and V. K. Leius. 1979. Histochemical patterns in the tadpole tail during normal and thyroxine-induced metamorphosis. II. Succinic dehydrogenase, Mg- and Ca-adenosine triphosphatases, thiamine pyrophosphatase, and 5'-nucleotidase. Gen. Comp. Endocrinol. 38: 111-126.

Karlseder, J., A. Smorgorzewska and T. de Lange. 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 295: 2446-2449.

Karp, G. and N. J. Berrill. 1981. Development. McGraw-Hill, New York.

Kawahara, A., Y. Gohda and A. Hikosaka. 1999. Role of type III iodothyronine 5-deiodinase gene expression in temporal regulation of Xenopus metamorphosis. Dev. Growth Dif: 41: 365-373.

Kenyon, C. 2001. A conserved regulatory system for aging. Cell 105: 165-168.

Kim, J., K. D. Irvine and S. B. Carroll. 1995. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. Cell 82: 795-802.

Kim, J., A. Sebring, J. J. Esch, M. E. Kraus, K. Vorwerk, J. Magee and S. B. Carroll. 1996. Integration of positional information and identity by Drosophila vestigial gene. Nature 382: 133-138.

Kirkwood, T. B. L. 1977. The evolution of aging. Nature 270: 301-304.

Kistler, A., K. Yoshizato and E. Frieden. 1977. Preferential binding of tri-substituted thyronine analogs by bullfrog tadpole tail fin cytosol. Endocrinology 100: 134-137.

Koelle, M. R., W. S. Talbot, W. A. Segraves, M. T. Bender, P. Cherbas and D. S. Hogness.1991. The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. Cell 67: 59-77.

Kollros, J. J. 1961. Mechanisms of amphibian metamorphosis: Hormones. Am. Zool. 1: 107-114.

Kuro-o, M. and 15 others.1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature 390: 45-51.

Larsen, P. L. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in C. elegans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8905-8909.

Lenhoff, H. M. 1991. Ethel Browne Harvey, Hans Spemann, and the discovery of the organizer phenomenon. Biol. Bull. 181: 72-80.

Lin, Y.-J., L. Seroude and S. Benzer. 1998. Extended life-span and stress resistance in the Drosophila mutant methuselah. Science 282: 943-946.

Lindroos, P. M., R. Zarnegar and G. K. Michalopoulos. 1991. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. Hepatology 13: 743-750.

Lo, D. C., F. Allen and J. P. Brockes. 1993. Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7230-7234.

Lynn, W. G. and A. M. Peadon. 1955. The role of the thyroid gland in direct development of the anuran Eleutherodactylus martinicenis. Growth 19: 263-286.

MacWilliams, H. K. 1983a. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. I. Properties of head inhibition. Dev. Biol. 96: 217-238.

MacWilliams, H. K. 1983b. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. II. Properties of head activation. Dev. Biol. 96: 239-272.

MacWilliams, H. K., F. C. Kafatos and W. H. Bossert. 1970. The feedback inhibition of basal disk regeneration in Hydra has a continuously variable intensity. Dev. Biol. 23: 380-398.

Maden, M. 1982. Vitamin A and pattern formation of the regenerating limb. Nature 295: 672-675.

Mangelsdorf, D. J and R. M. Evans. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 83: 841-850.

Mars, W. M., M. L. Liu, R. P. Kitson, R. H. Golfarb, M. K. Gabauer and G. K. Michalopoulos. 1995. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. Hepatology 21: 1695-1701.

Marsh-Armstrong, N., H. Huang, B. F. Remo, T. T. Liu and D. D. Brown. 1999. Asymmetric growth and development of the Xenopus laevis retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. Neuron 24: 871-878.

Martin, V. J. 1997. Cnidrians: The jellyfish and hydra. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.) Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 57-86.

McCutcheon, F. H. 1936. Hemoglobin function during the life history of the

bullfrog. J. Cell. Comp. Physiol. 8: 63-81

McGann, C. J., S. J. Odelberg and M. T. Keating. 2001. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13699-13704.

Medawar, P. B. 1952. An Unsolved Problem in Biology. H. K. Lewis, London.

Meinhardt, H. 1980. Cooperation of compartments for the generation of positional information. Z. Naturforsch. C 35: 1086-1091.

Meinhardt, H.1993. A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in hydra: How to form structures close to each other, how to form them at a distance. Dev. Biol. 157: 321-333.

Melov, S., J. A. Schnieder, B. J. Day, D. Hinerfeld, S. S. Coskunra, J. D. Crapo and D. C. Wallace. 1998. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial superoxide dismutase. Nature Genet. 18: 59-63.

Mescher, A. L. and D. Gospodarowicz.1979. Mitogenic effects of a growth factor derived from myelin on denervated regenerates of newt forelimbs. J. Exp. Zool. 207: 497-510.

Mescher, A. L. and R. A. Tassava.1975. Denervation effects on DNA replication and mitosis during the initiation of limb regeneration. in adult newts. Dev. Biol. 44: 187-197.

Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances. 1997. Liver regeneration. Science 276: 60-66.

Michikawa, Y., F. Mazzucchelli, N. Bresolin, G. Scarlato and G. Attardi. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. Science 286: 774-779.

Miller, J. K. 2001. Escaping senescence: Demographic data from the three-toed box turtle (Terrapene carolina triungis). Exp. Gerontol. 36: 829-832.

Mitchell, A. W. 1988. The Enchanted Canopy. Macmillan, New York.

Mullen, L. M., S. V. Bryant, M. A. Torok, B. Blumberg and D. M. Gardiner. 1996. Nerve dependency of regeneration: The role of Distalless and FGF signaling in amphibian limb regeneration. Development 122: 3487-3497.

Muneoka, K. and S. V. Bryant. 1982. Evidence that patterning mechanisms in developing and regeneratung limbs are the same. Nature 298: 369-371.

Murray, V. and R. Holliday. 1981. Increased error frequency of DNA polymerases from senescent fibroblasts. J. Mol. Biol. 146: 55-76.

Nakagawa, S., C. Brennan, K. G. Johnson, D. Shewan, W. A. Harris and C. E. Holt. 2000. Ephrin-B regulates the ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. Neuron 25: 599-610.

Nardi, J. B. and D. L. Stocum. 1983. Surface properties of regenerating limb cell: Evidence for gradation along the proximodistal axis. Differentiation 25: 27-31.

Neumann, C. J. and S. M. Cohen. 1996. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing. Development 122: 1781-1789.

Neumann, C. J. and S. M. Cohen. 1997. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. Development 121: 589-599.

Newman, S. A. 1974. The interaction of the organizing regions of hydra and its possible relation to the role of the cut end of regeneration. J. Embryol. Exp. Morphol 31: 541-555.

Niazi, I. A. and S. Saxena. 1978. Abnormal hindlimb regeneration in tadpoles of the toad Bufo andersonii exposed to excess vitamin A. Folia Biol. (Krakow) 26: 3-8

Nijhout, H. F. 1994. Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Nijhout, H. F. 1999. Control mechanisms of polyphenic development in insects. BioScience 49: 181-192.

Nijhout, H. F. and C. M. Williams.1974. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, landuca sexta: Cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. J. Exp. Biol. 61: 493-501.

Norris, D. O., R. E. Jones and B. B. Criley. 1973. Pituitary prolactin levels in larval, neotenic, and metamorphosed salamanders (Ambystoma tigrinum). Gen. Comp. Endocrinol. 20: 437-442.

Okada, T. S. 1991. Transdifferentiation.-Flexibility to Cell Differentiation. Oxford University Press, Oxford.

Oofusa, K. and K. Yoshizato. 1991. Biochemical and immunological characterization of collagenase in tissues of metamorphosing bullfrog tadpoles. Dev. Growth Diff. 33: 329-339.

Orgel, L. E. 1963. The maintenence of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49: 517-521.

Orr, W. S. and R. S. Sohal. 1994. Extension of lifespan by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. Science 263: 1128-1130.

Parkes, T. L., A. J. Elia, D. Dickinson, A. J. Hilliker, J. P. Phillips and G. L. Boulianne. 1998. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD I in motoneurons. Nature Genet. 19: 171-174.

Partridge, L. and D. Gems. 2002. Mechanisms of ageing: Public or private? Nature Rev. Genet. 3: 165-175.

Patterson, D., W. P. Hayes and Y. B. Shi. 1995. Transcriptional activation of the metalloproteinase gene stromelysin-3 coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis. Dev. Biol. 167: 252-262.

Pecorino, L. T., A. Entwistle and J. P. Brockes. 1996. Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximo-distal respecification. Curr. Biol. 6: 563-569.

Pfeiffer, S. and J. P. Vincent. 1999. Signalling at a distance: Transport of Wingless in the epidermis of Drosophila. Semin. Cell Dev. Biol. 10: 303-309.

Prahlad, K. V. and L. E. DeLanney.1965. A study of induced metamorphosis in the axolotl. J. Exp. Zool. 160: 137-146.

Rageh, M. A., L. Mendenhall, E. E. Moussad, S. E. Abbey, A. L. Mescher and R. A. Tassava. 2002. Vasculature in preblastema and nerve-dependent blastema stages of regenerating forelimbs of the adult newt, Notophthalmus viridiscens. J. Exp. Zool. 292: 255-266.

Rand, H. W., J. F. Board and D. E. Minnich. 1926. Localization of formative agencies in Hydra. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12: 565-570.

Restifo, L. L. and K. White. 1991. Mutations in a steroid hormone-regulated gene disrupt the metamorphosis of the central nervous system in Drosophila. Dev. Biol. 148: 174-194.

Restifo, L. L. and T. G. Wilson. 1998. A juvenile hormone agonist reveals distinct developmental pathways mediated by ecdysone-inducible Broad Complex transcription factors. Dev. Genet. 22: 141-159.

Richards, G. 1992. Switching partners? Curr. Biol. 2: 657-658.

Riddiford, L. M. 1972. Juvenile hormone in relation to the larval-pupal transforma-

Capítulo 19 La saga de la línea germinal

Y el final de toda nuestra exploración
Será llegar a donde comenzamos
Y conocer el lugar por primera vez
T. S. Eliot (1942)

Cuando los espermatozoides entran al gameto femenino, éste introduce una célula del sistema que ya había alcanzado cierto grado de organización.
Ernst Hadorn (1955)

Se comenzó el análisis del desarrollo animal con la discusión de la fecundación, y se finalizará el estudio del desarrollo individual con la examinación de la **gametogénesis**, conjunto de procesos por los que se forman el espermatozoide y el gameto femenino*. Las células germinales proporcionan la continuidad de la vida entre las generaciones y los antepasados mitóticos de nuestras propias células germinales que una vez residieron en las gónadas de reptiles, anfibios, peces e invertebrados.

En muchos animales, tales como insectos, gusanos redondos y vertebrados, hay una separación clara y temprana entre las células germinales y los tipos celulares somáticos. En varios phyla animales (y a través de la totalidad del reino de las plantas), esta división no está tan bien establecida. En estas especies (que incluye cnidarios, gusanos planos y tunicados), las células somáticas pueden convertirse fácilmente en células germinales, incluso en los organismos adultos. Los zooides, yemas y pólipos de muchos phyla de invertebrados atestiguan la capacidad de las células somáticas para dar origen a nuevos individuos (Liu y Berrill 1948; Buss 1987).

En aquellos organismos en los que hay una línea germinal establecida que se separa de las células somáticas temprano en el desarrollo, las células germinales no se originan dentro de la gónada misma. En su lugar, sus precursores –las **células germinales primordiales (CGP)**– se originan en otro sitio y migran hacia las gónadas en desarrollo. La primera etapa en la gametogénesis, entonces, involucra la formación de las CGP y que lleguen a la cresta genital a medida que se está formando la gónada. La discusión de la gametogénesis incluirá:

1. La formación del plasma germinal y la determinación de las CGP.
2. La migración de las CGP hacia las gónadas en desarrollo.
3. El proceso de meiosis y las modificaciones de la meiosis para la formación de espermatozoides y de gametos femeninos.
4. La diferenciación del espermatozoide y del gameto femenino.
5. El control hormonal de la maduración de los gametos y la ovulación.

El plasma germinal y la determinación de las células germinales primordiales

Todos los organismos que se reproducen sexualmente se originan a partir de la fusión de gametos: espermatozoide y gameto femenino. Todos los gametos se originan a partir de las células germinales primordiales. En muchos ca-

* *Nota del traductor:* se utilizará la denominación de gameto femenino en lugar de la palabra huevo (*egg*), cuyo significado, como ya fue explicado antes, puede resultar confuso. Óvulo resulta inapropiado, ya que no todos los casos completan la meiosis II. En cada especie, de acuerdo con el estadio de desarrollo, se indicará el nombre que le corresponde (óvulo, ovocito II, etc.).

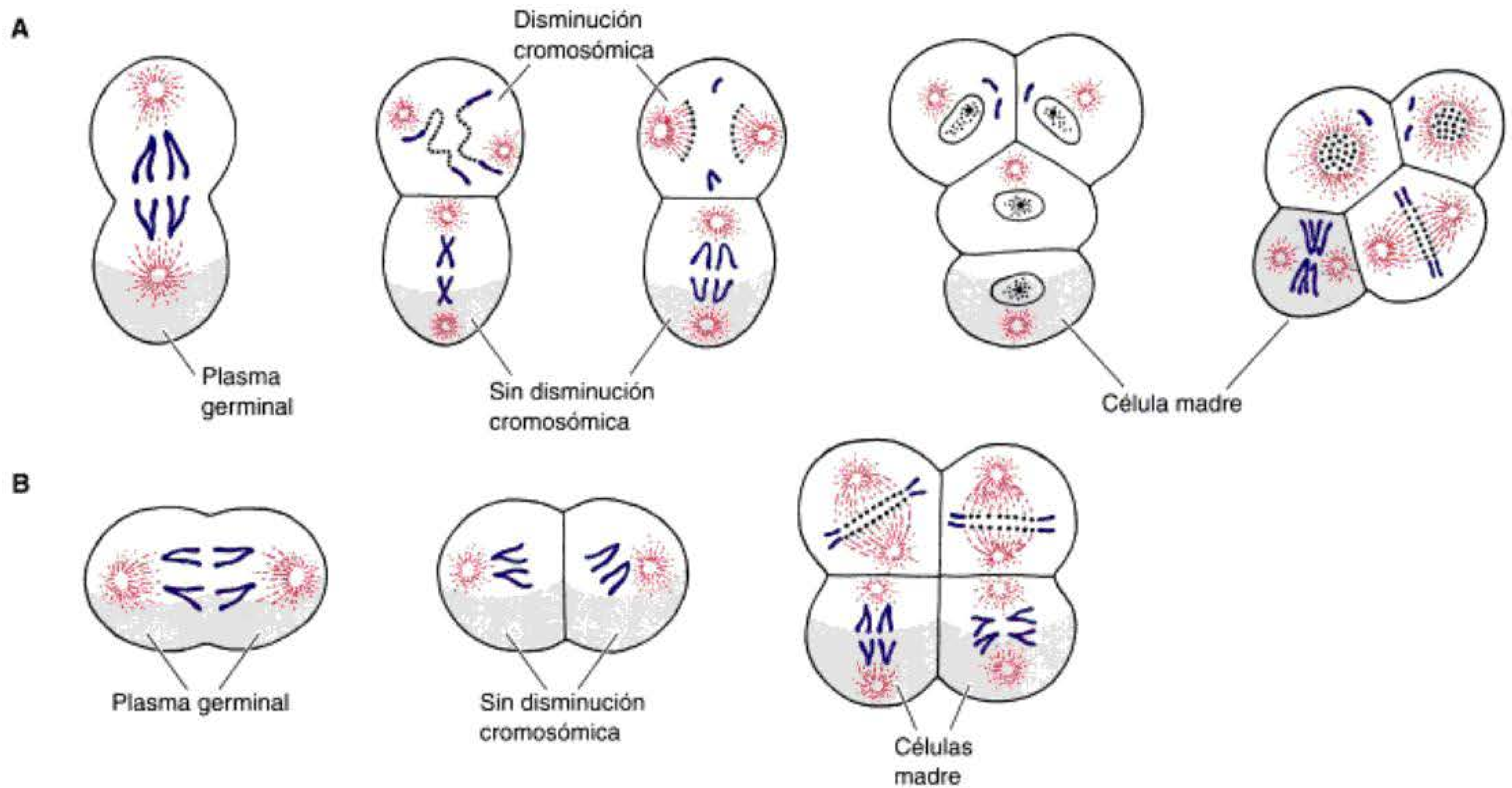


Fig. 19-1. Distribución del plasma germinal durante la segmentación de cigotos, **A**, normales y **B**, centrifugados de *Parascaris*. **A.** El plasma germinal normalmente es conservado en la blastómera más vegetal, como se demuestra por la falta de disminución cromosómica en esta célula particular. Por lo tanto, en el estadio de 4 células, el embrión tiene una célula madre para sus gametos. **B.** Cuando la primera segmentación es desplazada 90° mediante centrifugación, ambas células obtenidas tienen plasma germinal vegetal y ninguna célula experimenta disminución cromosómica. Después de la segunda segmentación, estas dos células dan origen a las células madre germinales. (Según Waddington 1966.)

sos (incluidos ranas, nematodos y moscas), las células germinales primordiales son especificadas autónomamente por determinantes citoplasmáticos en el gameto femenino que luego, durante la segmentación, son repartidos a células específicas. En otros casos (como salamandras y mamíferos), las células germinales son especificadas mediante interacciones entre las células vecinas. En aquellas especies en las que la determinación de las células germinales primordiales es ocasionada por localización autónoma de proteínas y mRNA específicos, estos componentes citoplasmáticos son referidos colectivamente como el plasma germinal.

Determinación de la célula germinal en los nematodos

Theodor Boveri (1862-1915; véase fig. 4-2) fue la primera persona en observar los cromosomas de un organismo durante su desarrollo. Haciendo esto, él descubrió una característica fascinante en el desarrollo del gusano redondo *Parascaris aequorum* (antes *Ascaris megalocephala*). Este nematodo tiene solamente dos cromosomas por célula haploide, lo que permite minuciosas observaciones de los cromosomas individuales. El plano de segmentación de la primera división embrionaria es poco común debido a que es ecuatorial, separando la mitad animal de la mitad vegetal del cigoto (fig. 19-1A). Sin embargo, más estrambótica es la conducta de los cromosomas en las posteriores divisiones de estas dos primeras blastómeras. Los extremos de los cromosomas en la blastómera animal se fragmentan en una docena de partes justo antes de que la célula se divida. Este fenómeno es denominado **disminución del cromosoma**, debido a que solamente sobrevive una porción del cromosoma original. Se pierden numerosos genes cuando los fragmentos cromosómicos y estos genes no son incluidos en los núcleos recién formados (Tobler y col. 1972; Müller y col. 1996).

Mientras tanto, en la blastómera vegetal, los cromosomas siguen siendo normales. Durante la segunda segmentación, las células animales se separan meridionalmente mientras que las células vegetales nuevamente se dividen ecuatorialmente. Las células vegetalmente derivadas tienen cromosomas normales. Sin embargo, los cromosomas de estas dos blastómeras vegetales más animalmente localizadas se fragmentan antes de la tercera segmentación. Por lo tanto, en el estadio de 4 células, solamente una célula –la más vegetal– contiene un juego completo de genes. En segmentaciones sucesivas, los núcleos con cromosomas disminuidos son soltados de esta línea más vegetal hasta el estadio de 16 células, cuando hay solamente dos células con cromosomas sin disminuir. Una de estas dos blastómeras da origen a las células germinales; la otra finalmente experimenta disminución cromosómica y forma más células somáticas. Los cromosomas se conservan intactos solamente en aquellas células destinadas a formar la línea germinal. Si éste no fuera el caso, la información genética podría degenerar de una generación a la siguiente. Las células que han experimentado disminución cromosómica generan las células somáticas.

Boveri ha sido denominado el último de los grandes "observadores" de la embriología y el primero de los grandes experimentadores. No satisfecho con la observación de la conservación del complemento cromosómico

completo por los precursores de las células germinales, él intentó analizar si una región específica del citoplasma protege de la disminución a los núcleos dentro de ésta. De ser así, cualquier núcleo que por casualidad se localice en esta región debería mantenerse sin disminución. Boveri (1910) examinó esta hipótesis mediante la centrifugación de los huevos de *Parascaris* poco antes de su primera segmentación. Este tratamiento cambió la orientación del huso mitótico. Cuando el huso se forma perpendicular a su orientación normal, ambas blastómeras resultantes deberían contener algo del citoplasma vegetal (véase fig. 19-1B). En efecto, Boveri encontró que después de la primera división, ningún núcleo experimentaba disminución cromosómica. Sin embargo, la siguiente división fue ecuatorial a lo largo del eje animal-vegetal. Aquí las blastómeras animales resultantes experimentaron disminución, mientras que las dos células vegetales no lo hicieron. Boveri concluyó que el citoplasma vegetal contiene un factor (o factores) que protegen a los núcleos de la disminución cromosómica y determinan a las células germinales.

En el nematodo *C. elegans*, la célula precursora de la línea germinal es la blastómera P4. Los **gránulos-P** ingresan a la célula y parecen ser críticos para instruirlas a convertirse en precursoras de la línea germinal (véase fig. 8-43). Los componentes de los gránulos-P incluyen varios inhibidores de la transcripción y proteínas de unión al RNA, y además las proteínas homólogas de la *Drosophila* Vasa y Nanos, cuyas funciones se discutirán a continuación (Kawasaki y col. 1998; Seydoux y Strome 1999; Subramanian y Seydoux 1999).

SITIO WEB 19.1 **Mecanismos de la disminución cromosómica (Mechanisms of chromosome diminution).** Las células somáticas no pierden DNA azarosamente. En su lugar, se pierden regiones específicas del DNA durante la disminución cromosómica.

Determinación de la célula germinal en los insectos

En *Drosophila*, las CGP forman un grupo de células (**células polares**) en el polo posterior del blastodermo en celularización. Estos núcleos migran hacia la región posterior en la novena división nuclear y llegan a rodearse por el **plasma polar**, una compleja colección de mitocondria, fibrillas y **gránulos polares** (fig. 19-2; Mahowald 1971a,b; Schubiger y Wood 1977). Si se impide que los núcleos de las células polares alcancen el plasma polar, no se producirán células germinales (Mahowald y col. 1979).

La naturaleza ha proporcionado la confirmación de la importancia del plasma polar y de sus gránulos polares. Uno de los componentes del plasma polar es el mRNA del gen ***germ cell-less*** (***gcl***). Este gen fue descubierto por Jongens y col. (1992) cuando mutaron a *Drosophila* e investigaron para las hembras que no tenían descendencia de su descendencia (*grandoffsprings*). Presumieron que si una hembra no colocaba plasma polar funcional en sus huevos, todavía podría tener crías, pero las crías serían estériles (debido a que deberían carecer de células germinales). El gen *gcl* tipo salvaje es trascrito en las células nodrizas del ovario de la mosca y su mRNA es transportado hacia los huevos. Una vez dentro del huevo, es transportado hacia la porción más posterior y se localiza dentro de lo que llegará a ser el plasma polar (fig. 19-3A). Este mensaje es traducido hacia proteína durante los estadios tempranos de segmentación (fig. 19-3C). La proteína que codifica *gcl* parece ingresar en el núcleo y es esencial para la producción de células polares. Las moscas con mutaciones de este gen carecen de células germinales (fig. 19-3B, D).

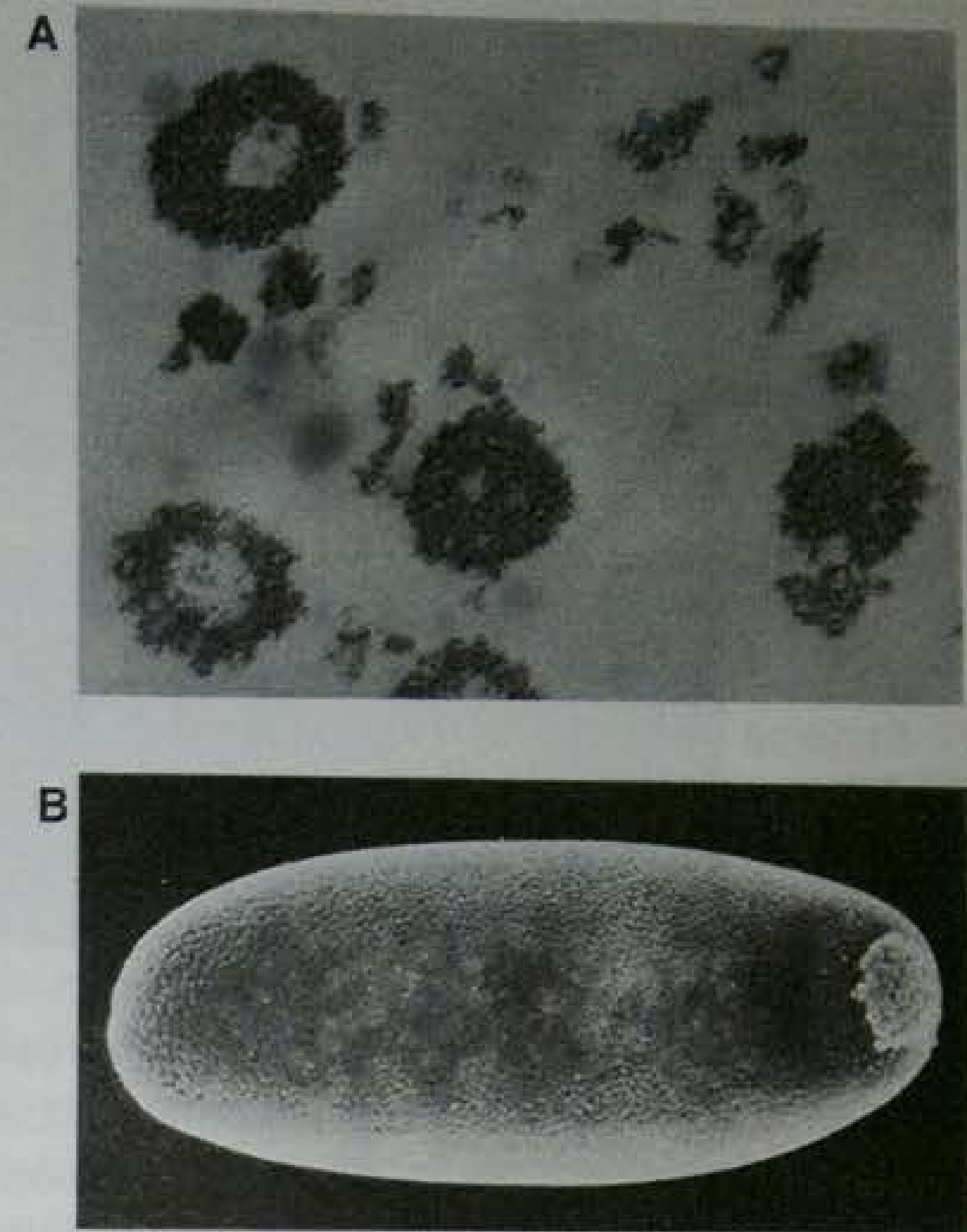


Fig. 19-2. Plasma polar de *Drosophila*. A. Microfotografía electrónica de gránulos polares de una fracción particular de células polares de *Drosophila*. B. Microfotografía electrónica de barrido de un embrión de *Drosophila* justo antes de finalizar la segmentación. Las células polares pueden verse a la derecha de esta imagen. (Microfotografías cortesía de A. P. Mahowald.)

VADE MECUM[2] **Células germinales en el embrión de *Drosophila* (Germ cells in the *Drosophila* embryo).** Este segmento sigue a las células germinales primordiales de embriones vivos de *Drosophila* desde su formación como células polares durante la gastrulación a medida que se mueven desde el extremo posterior del embrión hacia la región de la gónada en desarrollo.
[Hacer clic sobre Fruit Fly]

Una segunda serie de componentes del plasma polar son los determinantes posteriores mencionados en el capítulo 9. **Oskar** parece ser la proteína crítica de este grupo, debido a que la expresión del mRNA de *oskar* en sitios ectópicos hará que los núcleos en aquellas áreas formen células germinales. Los genes que restringen a Oskar al polo posterior también son necesarios para la formación de la célula germinal (Ephrussi y Lehmann 1992; Newmark y col. 1997; Riechmann y col. 2002). Además, Oskar parece ser el paso limitante de la forma-

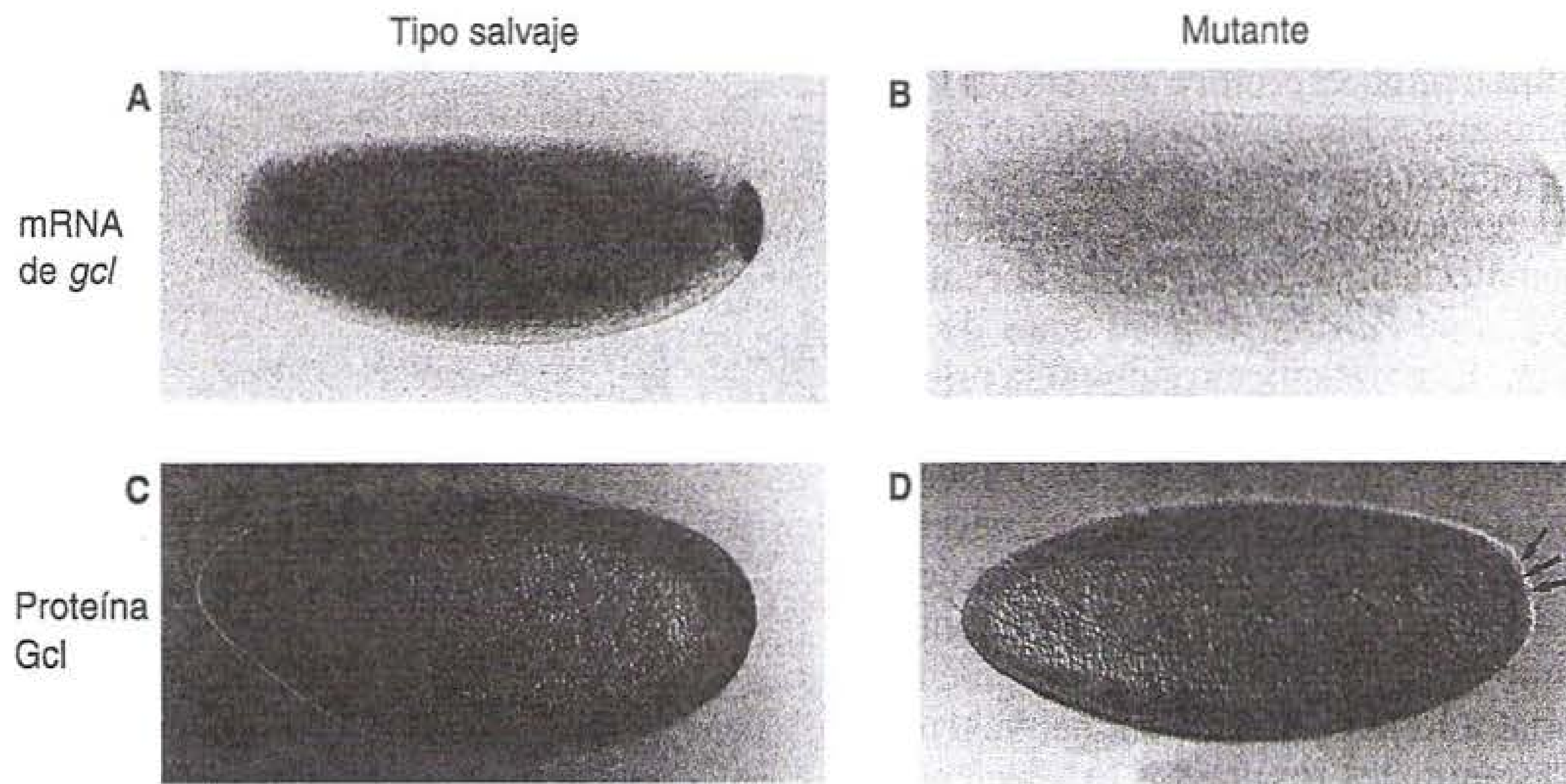


Fig. 19-3. Localización de los productos del gen *germ cell-less* en la región posterior del huevo y del embrión. **A, B.** El mRNA de *gcl* puede verse en el polo posterior de los embriones de segmentación temprana producidos por las hembras tipo salvaje (A), pero no en los embriones producidos por las hembras mutantes deficientes de *gcl* (B). **C, D.** La proteína codificada por el gen *gcl* puede detectarse en las células germinales en el estadio de blastodermo celular de los embriones producidos por las hembras tipo salvaje (C), pero no en los embriones de las hembras mutantes (D). (De Jongens y col. 1992; microfotografía cortesía de T. A. Jongens.)

ción de la célula germinal, debido a que el agregado de más mensajero de *oskar* al ovocito causa la formación de más células germinales (Ephrussi y Lehmann 1992). Oskar funciona haciendo que se localicen las proteínas y RNA necesarios para la formación de la célula germinal. Uno de estos RNA es el mensajero *nanos*, cuyo producto es esencial para la formación del segmento posterior. **Nanos** también es esencial para la formación de la célula germinal. Las células polares que carecen de Nanos no migran hacia las gónadas y fracasan en convertirse en gametos. Nanos parece ser importante en impedir la mitosis y la transcripción durante el desarrollo de la célula germinal (Kobayashi y col. 1996; Deshpande y col. 1999). Otro de estos RNA codifican **Vasa**, una proteína de unión al RNA. Los mRNA para esta proteína se observan en el plasma germinal de muchas especies.

Un tercer componente del plasma germinal, el **RNA ribosómico mitocondrial (mtrRNA)**, fue una gran sorpresa. Kobayashi y Okada (1989) demostraron que la inyección de mtrRNA en los embriones formados desde huevos irradiados con radiación ultravioleta restablece la capacidad de estos embriones para formar células polares. Además, en los huevos de mosca normal, los mtrRNA pequeño y grande están localizados fuera de la mitocondria exclusivamente en el plasma polar de los embriones en estadio de segmentación, donde ellos aparecen como componentes de los gránulos polares (Kobayashi y col. 1993; Amikura y col. 1996; Kashikawa y col. 1999). Mientras que el mtrRNA está involucrado en dirigir la formación de las células polares, éste no ingresa en ellas. La proteína Tudor se localiza en el plasma germinal y parece ser crítica para la exportación de estos mtrRNA desde la mitocondria y hacia el citoplasma (Amikura y col. 2001).

Un cuarto componente del plasma polar de *Drosophila* (y uno que llega a estar localizado en los gránulos polares) es un RNA no traducible denominado **componente del gránulo polar (CGP)**. Mientras que se desconoce su función exacta, las células polares de las moscas hembras transgénicas que producen RNA antisentido contra los CGP fracasan en migrar hacia las gónadas (Nakamura y col. 1996).

SITIO WEB 19.2 **El plasma germinal del insecto (The insect germ plasm).** El citoplasma germinal del insecto fue descubierto tan temprano como en 1911, cuando Hegner halló que la extirpación del citoplasma del polo posterior de los huevos del escarabajo causaba esterilidad en los adultos resultantes.

Determinación de la célula germinal en los anfibios

La localización citoplasmática de los determinantes de la célula germinal también ha sido observada en los embriones de vertebrados. Bounoure (1934) demostró que la región vegetal de los huevos de rana fecundados contiene material con propiedades de tinción semejantes a aquellas del plasma polar de *Drosophila* (fig. 19-4). Él fue capaz de trazar este citoplasma cortical hasta pocas células en el endodermo presuntivo que normalmente debería migrar hacia la cresta genital. Mediante el trasplante de células genéticamente marcadas desde un embrión hacia otro de una cepa marcada diferentemente, Blackler (1962) demostró que estas células son los precursores de las células germinales primordiales. El plasma germinal de los anfibios consiste en gránulos germinales y de una matriz alrededor de ellos. Éste contiene muchos de los RNA y proteínas (incluidos el RNA ribosómico grande y el pequeño) hallados en el plasma germinal de *Drosophila* y ellos parecen reprimir la transcripción y la traducción (Kloc y col. 2002).

Los movimientos tempranos del plasma germinal en anfibios han sido analizados en detalle por Savage y Danilchik (1993), quienes marcaron el plasma de la célula germinal con un colorante fluorescente. Ellos hallaron que el plasma germinal de los huevos sin fecundar con-

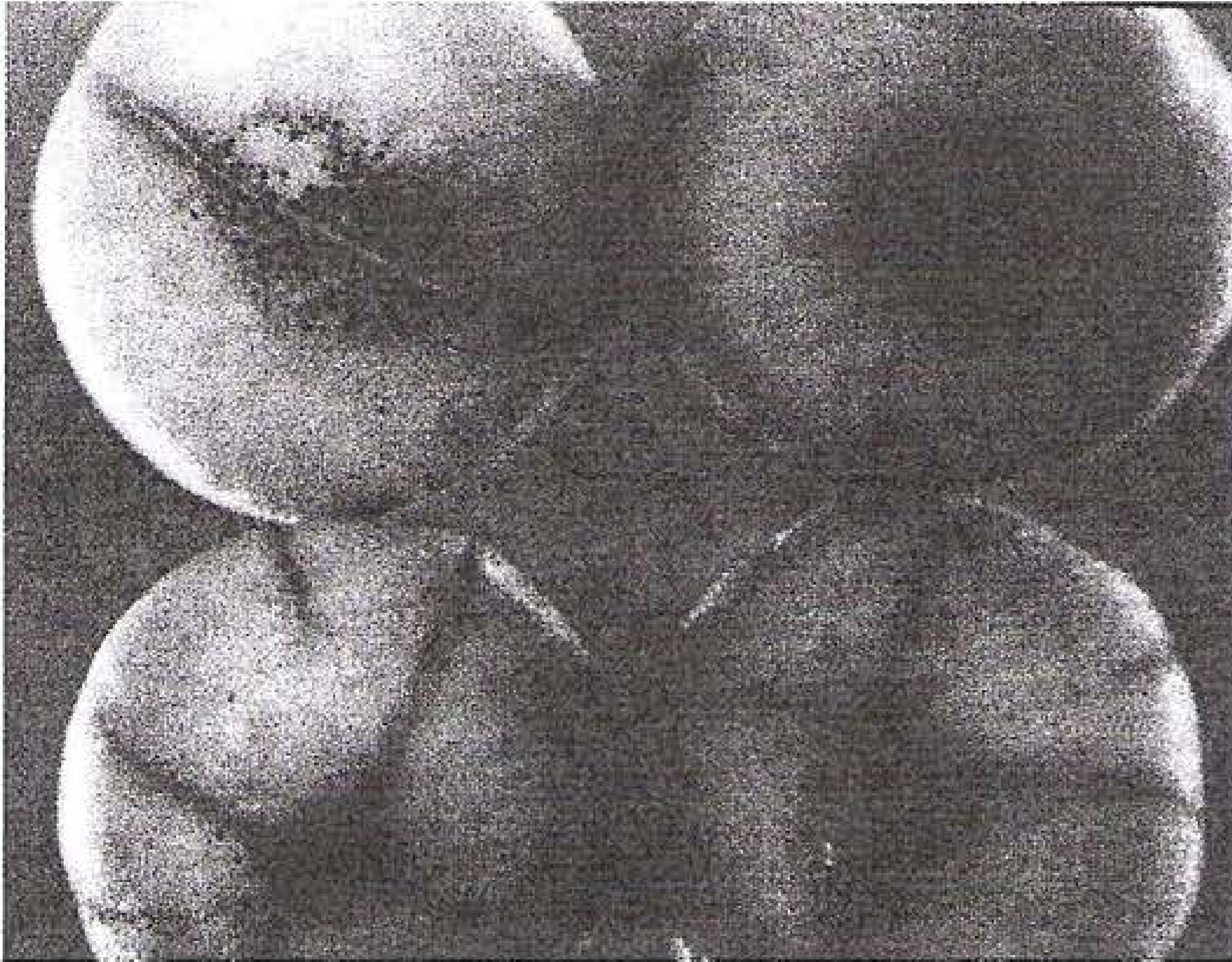


Fig. 19-4. Plasma germinal en el polo vegetal de los embriones de rana. La hibridación in situ para el mRNA de *Xcat2* (el homólogo de *Xenopus* de *Nanos*) localiza el mensajero en la corteza vegetal de los embriones en la primera segmentación (superior) y en la cuarta segmenación (inferior). (Según Kloc y col. 1998; fotografía cortesía de L. Etkin.)

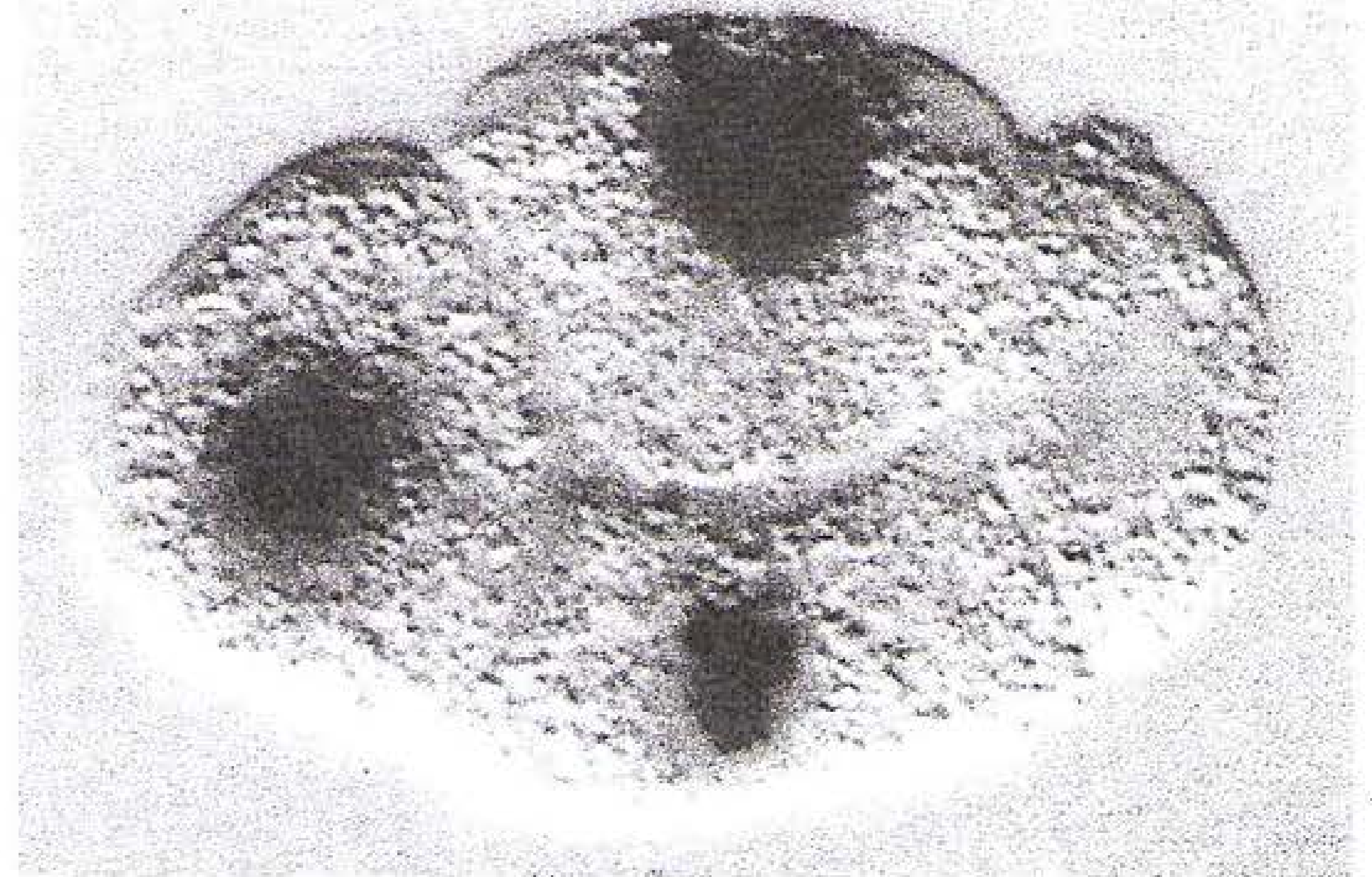


Fig. 19-5. Inhibición de la transcripción en los precursores de las células germinales de *C. elegans*. La microfotografía muestra una hibridación in situ para el mRNA de β-galactosidasa expresado bajo el control del promotor de *pes-10*. El gen *pes-10* es uno de los genes que más temprano se expresan en *C. elegans*. La blastómera P que da origen a las células germinales no transcribe el gen. (De Seydoux y Fire 1994; microfotografía cortesía de G. Seydoux.)

siste en minúsculas "islas" que parecen ser amarradas a la masa de vitelo cerca de la corteza vegetal. Estas islas de plasma germinal se mueven con la masa de vitelo vegetal durante la rotación cortical justo después de la fecundación. Después de la rotación, las islas son liberadas de la masa de vitelo y comienzan a fusionarse entre sí, y migran hacia el polo vegetal. Su agregación depende de los microtúbulos y sus movimientos hacia el polo vegetal dependen de una proteína tipo cinesina que puede actuar como el motor para el movimiento del plasma germinal (Robb y col. 1996; Quaas y Wylie 2002). Savage y Danilchik (1993) hallaron que la luz UV impide las contracciones de la superficie vegetal e inhibe la migración del plasma germinal hacia el polo vegetal. Además, los mensajeros *nanos* y *vasa* homólogos de *Xenopus* son localizados específicamente en la región vegetal (Forristall y col. 1995; Ikenishi y col. 1996; Zhou y King 1996). Entonces, como el plasma polar de *Drosophila*, el citoplasma de la región vegetal del cigoto de *Xenopus* contiene los determinantes para la formación de la célula geminal. Además, varios de los componentes son los mismos en las dos especies.

La hipótesis de genoma inerte

Todos los componentes del plasma germinal no han sido catalogados. En efecto, en aves y mamíferos, tal lista casi ni ha sido comenzada. Además, todavía no se conocen las funciones de las proteínas (tales como Vasa y Nanos) y de los RNA no traducidos encontrados en el plasma germinal. Una hipótesis (Nieuwkoop y Sutasurya 1981; Wylie 1999) es que los componentes del plasma germinal inhiben la transcripción y la traducción, evitando de este modo que las células que lo contienen se diferencien en algo más. De acuerdo con esta hipótesis, las células se convierten en células germinales debido a que se les prohíbe convertirse en cualquier otro tipo de célula. Esta supresión de la transcripción se observa en las células germinales de varias especies, incluyendo las moscas, ranas y nematodos (fig. 19-5). Muchas de las proteínas en el plasma germinal (tal como Gcl) actúan mediante la inhibición de la transcripción o de la traducción (Leatherman y col. 2002).

Migración celular germinal

Migración celular germinal en los anfibios

El plasma germinal de los anfibios anuros (ranas y sapos) se acumula alrededor del polo vegetal en el cigoto. Durante la segmentación, este material es traído hacia arriba a través del citoplasma vitelínico. Las contracciones periódicas de la superficie celular vegetal parecen empujarlo a lo largo de los surcos de segmentación de las blastómeras recién formadas. El plasma germinal finalmente llega a estar asociado con las células endodérmicas que revisten el piso del blastocele (fig. 19-4; véase además fig. 19-6A-E; Bounoure 1934; Ressom y Dixon 1988; Kloc y col. 1983). Las CGP llegan a estar concentradas en la región posterior del intestino larval y a medida que se forma la cavidad abdominal, migran a lo largo del lado dorsal del intestino, primero a lo largo del mesenterio dorsal (que conecta el intestino a la región donde están formándose los órganos mesodérmicos) y luego a lo largo de la pared abdominal y hacia las crestas genitales. Ellas migran hacia arriba por este tejido hasta que alcanzan a las gónadas en desarrollo (fig. 19-6F). Las CGP de *Xenopus* se mueven mediante la extrusión de un único filopodio y haciendo correr, entonces, su citoplasma vitelínico hacia el interior del filopodio mientras retraen su "cola." En esta migración parece muy probable la guía por contacto ya que las CGP y la matriz extracelular sobre la que ellas migran están orientadas en la dirección de la migración (Wylie y col. 1979). Además, la adhesión y migración de la CGP puede inhibirse si el mesenterio es

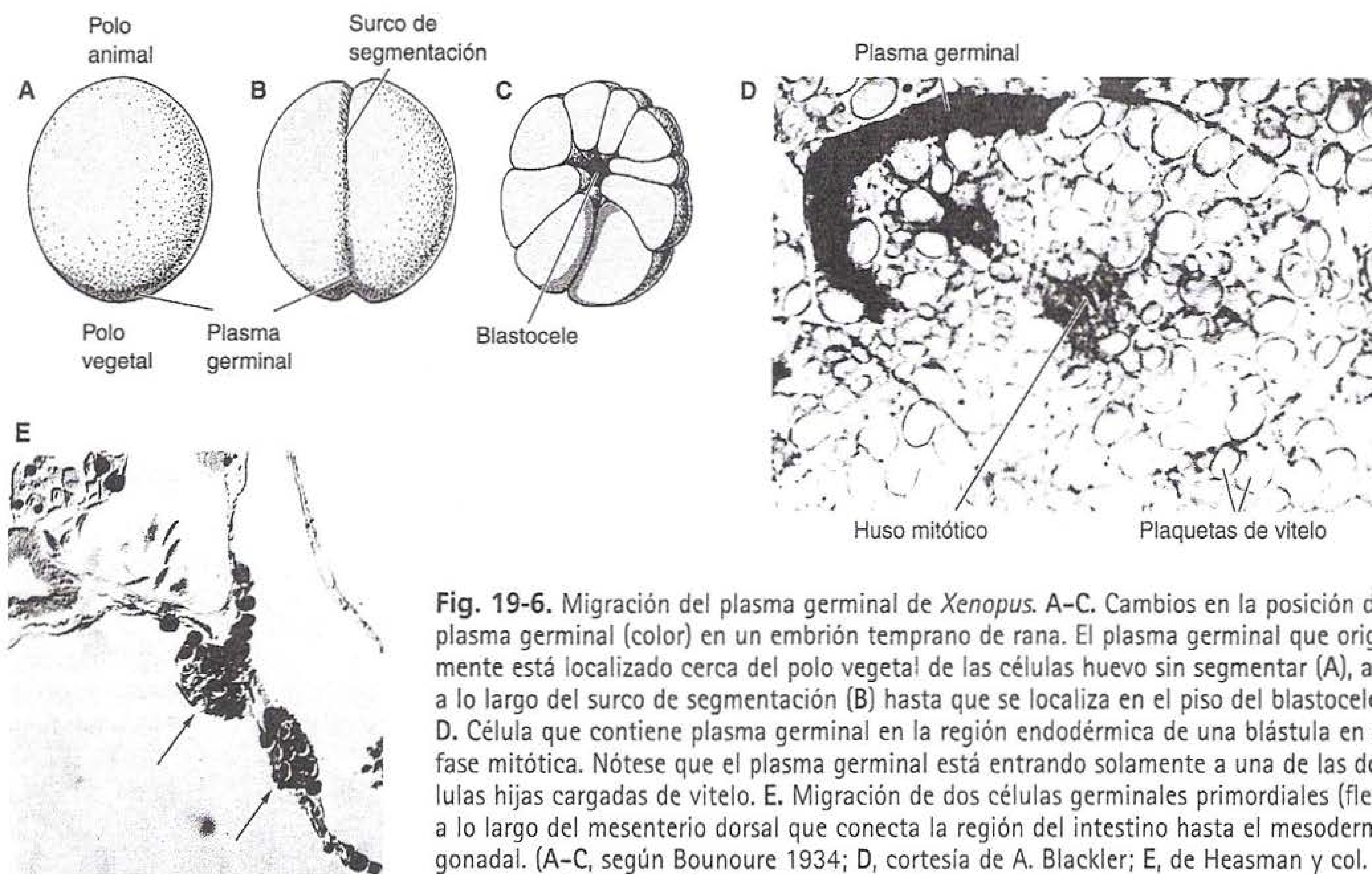


Fig. 19-6. Migración del plasma germinal de *Xenopus*. **A-C.** Cambios en la posición del plasma germinal (color) en un embrión temprano de rana. El plasma germinal que originalmente está localizado cerca del polo vegetal de las células huevo sin segmentar (A), avanza a lo largo del surco de segmentación (B) hasta que se localiza en el piso del blastocele (C). **D.** Célula que contiene plasma germinal en la región endodérmica de una blástula en anafase mitótica. Nótese que el plasma germinal está entrando solamente a una de las dos células hijas cargadas de vitelo. **E.** Migración de dos células germinales primordiales (flechas) a lo largo del mesenterio dorsal que conecta la región del intestino hasta el mesodermo gonadal. (A-C, según Bounoure 1934; D, cortesía de A. Blackler; E, de Heasman y col. 1977, cortesía de los autores.)

tratado con anticuerpos contra la fibronectina de *Xenopus* (Heasman y col. 1981). Por lo tanto, la vía para la migración de las células germinales en estas ranas parece estar compuesta de matriz extracelular orientada conteniendo fibronectina. Las fibrillas sobre las cuales las CGP viajan pierden su polaridad poco tiempo después de que la migración ha finalizado.* A medida que ellas migran, las CGP de *Xenopus* se dividen cerca de tres veces y 30 CGP, aproximadamente, colonizan las gónadas (Whitington y Dixon 1975; Wylie y Heasman 1993). Estas células se dividirán para formar las células germinales.

Las células germinales primordiales de los anfibios urodelos (salamandras) tienen aparentemente un origen diferente, que ha sido trazado por experimentos de trasplantes recíprocos hacia las regiones del mesodermo que involucionan a través de los labios ventrolaterales del blastoporo. Además, no parece haber un "plasma germinal" particular localizado en los huevos de salamandra. En su lugar, la interacción de las células del endodermo dorsal y de las células del hemisferio animal crean las condiciones necesarias para formar células germinales en las áreas que involucionan a través de los labios ventrolaterales (Sutasurya y Nieuwkoop 1974; Wakahara 1996). De modo tal que en salamandras, las CGP se forman por inducción dentro de la región mesodérmica y presumiblemente siguiendo un camino diferente hacia las gónadas.

Formación y migración de la célula germinal en los mamíferos

No hay un plasma germinal obvio en mamíferos, y las células germinales de los mamíferos no son morfológicamente distintas durante el desarrollo temprano. En su lugar, las células germinales son inducidas en el embrión. En ratones, las células germinales se forman en la región posterior del epiblasto, en la unión del ectodermo extraembrionario, el epiblasto, la línea primitiva y la alantoides (fig. 19-7A). En el día 6,5 del desarrollo embrionario, BMP4 y BMP8b desde el ectodermo extraembrionario le dan a ciertas células en esta área la capacidad para producir células germinales (Lawson y col. 1999; Ying y col. 2000). Los grupos de células capaces de generar CGP expresan *fragilis*, un gen que codifica una proteína de transmembrana particular. Sin embargo, estas células que expresan *fragilis* pueden formar CGP y algunas células somáticas. En el centro de este grupo de células está un pequeño grupo de células que también expresan *stella*.* Estas células están restringidas al destino celular germinal (Saitou y col. 2002).

* Esta afirmación no necesariamente tiene que ser verdadera para todos los anuros. En la rana *Rana pipiens*, las células germinales siguen un recorrido similar, pero pueden ser viajeros pasivos a lo largo de mesenterio en lugar de ser células móvilmente activas (Subtelny y Penkala 1984). La migración de las CGP del pez sigue un recorrido similar y puede haber muchas diferencias de especies respecto de si las CGP son viajeras activas o pasivas (Braat y col. 2000).

* No se sabe qué hace la proteína Stella. La secuencia de esta proteína da pocas pistas además de que contiene algunas regiones muy básicas (y por esta razón podría ser capaz de asociarse con ácidos nucleicos) y que tiene un motivo de factor de empalme en su extremo carboxilo terminal. Por tal razón podría estar involucrada en la organización cromosómica o en el procesamiento del RNA.

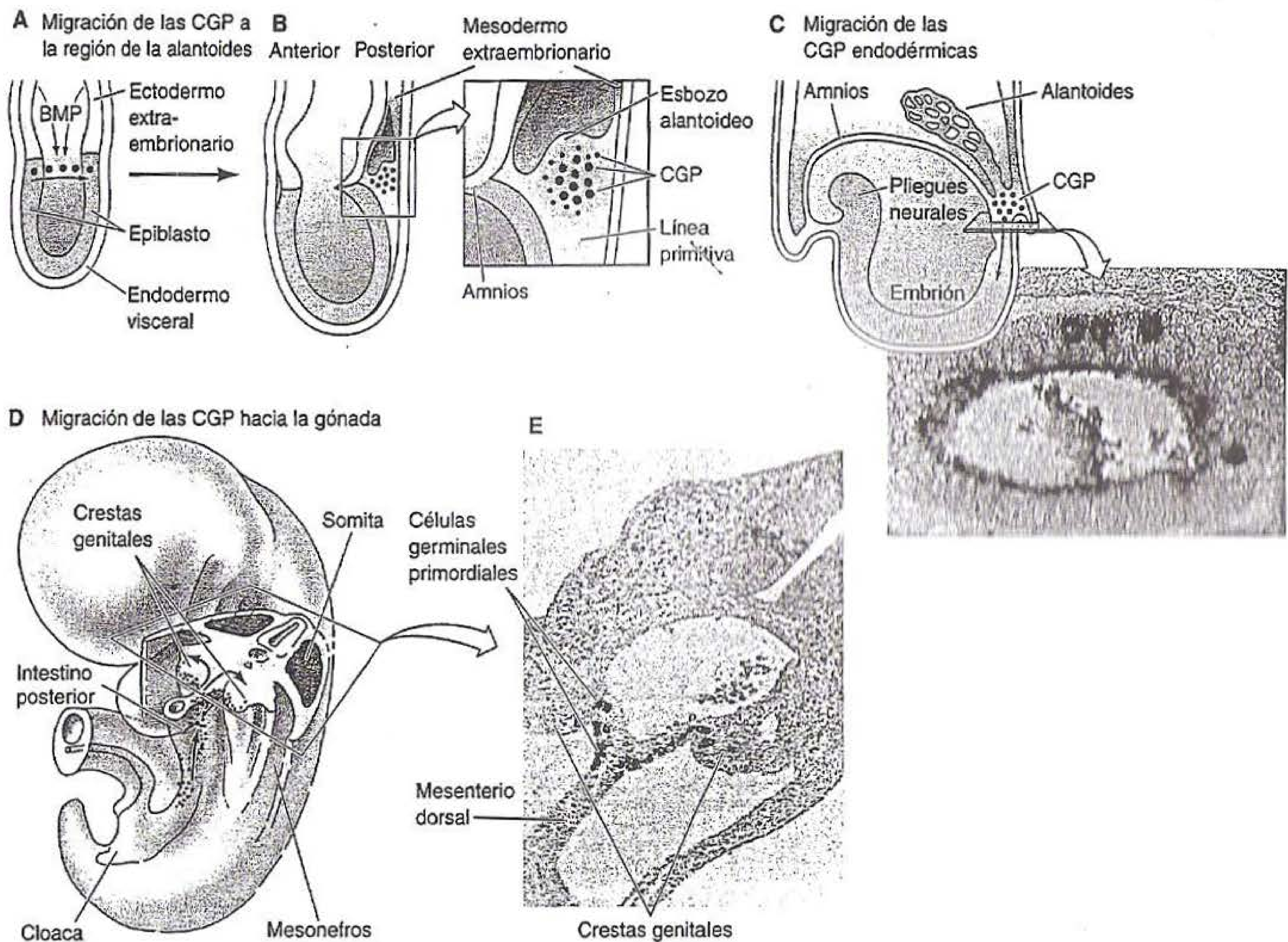


Fig. 19-7. Caminos para la migración de las células germinales primordiales de mamíferos. **A.** En el embrión de ratón, las señales de BMP (azul) del ectodermo extraembrionario inducen a las células epiblásticas vecinales (círculos violeta) para convertirse en precursoras de CGP y en mesodermo extraembrionario. Durante la gastrulación (flecha), estas células se localizan en el epiblasto posterior. **B.** Hacia el día embrionario 7, estas células surgen de la línea primitiva posterior. Estas células expresan *fragilis* (verde), y en el centro de este grupo están los precursores de la CGP que también expresan *stella* (verde oscuro y rojo). **C.** Sobre el día 8, estas células migran hacia el endodermo definitivo del embrión. El recuadro muestra cuatro grandes CGP en el intestino posterior de un embrión de ratón teñido positivamente para niveles elevados de fosfatasa alcalina. **D.** Las CGP migran a través del intestino y, dorsalmente, hacia las crestas genitales. **E.** Tales células teñidas de fosfatasa alcalina pueden verse entrando a las crestas genitales alrededor del día embrionario 11. (A-C, según Hogan 2002; C, fotografía de Heath 1978; E, de Mintz 1957; microfotografías cortesía de los autores.)

Basado en la tinción diferencial de tejido fijado, desde hace mucho tiempo se ha pensado que los precursores de la célula germinal de ratón migran desde el epiblasto hacia el mesodermo extraembrionario y luego regresan nuevamente hacia el embrión por el camino de la alantoides (véase Chiquoine 1954; Mintz 1957 y ediciones iniciales de este texto). Sin embargo, la capacidad para marcar células germinales primordiales de ratón con proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*) y la observación de células vivas que migran ha provocado una reevaluación del camino de migración de la célula germinal en mamíferos (Anderson y col. 2000; Molyneaux y col. 2001). En primer lugar, parece que las CGP de mamíferos migran directamente hacia el endodermo desde la región posterior de la línea primitiva. (Se cree que las células que ingresan en la alantoides mueren.) Estas células que están expresando *stella* se encuentran en el intestino posterior. Aunque se mueven activamente, no pueden ir fuera del intestino hasta cerca del día embrionario 9. En este momento, las CGP salen del intestino pero todavía no migran hacia las crestas genitales. Sin embargo, al día siguiente, se observa a las CGP migrando hacia las crestas genitales (fig. 19-7E). Hacia el día embrionario 11,5, las CGP ingresan en las gónadas en desarrollo. Durante este paseo han proliferado desde una población inicial de 10-100 células a 2500-5000 CGP presentes en las gónadas hacia el día 12 (fig. 19-8).

Como las CGP de *Xenopus*, las CGP de mamíferos parecen estar estrechamente asociadas con las células sobre las que ellas migran, y ellas se mueven mediante la extensión de filopodios sobre las superficies celulares subyacentes. Estas células también son capaces de penetrar las monocapas celulares y de migrar a través de las láminas celulares (Stott y Wylie 1986). Los mecanismos por los cuales las CGP conocen el camino de su viaje son desconocidos. La fibronectina parece ser un sustrato importante para la migración de las CGP (ffrench-Constant y col. 1991), y las células germinales que carecen del receptor de integrina para tales proteínas de la matriz extracelular no pueden migrar hacia las gónadas (Anderson y

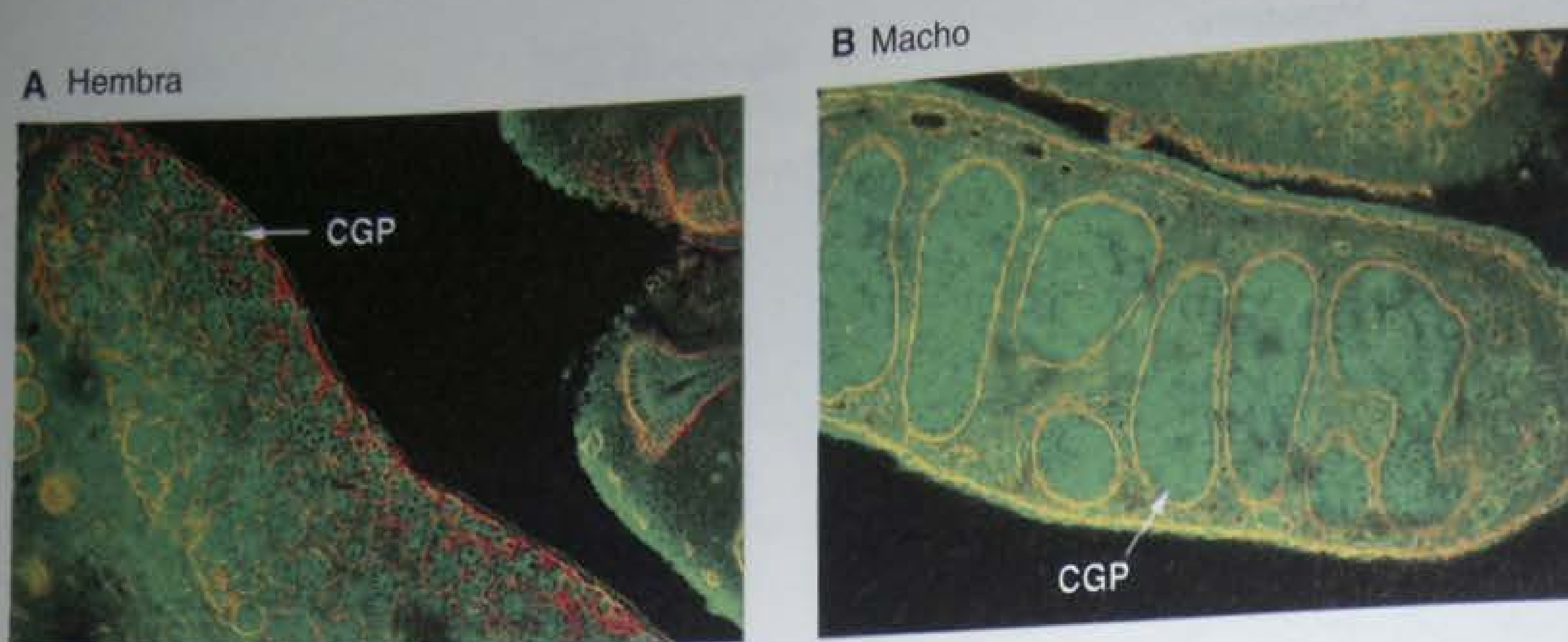


Fig. 19-8. Gónadas de embriones de ratón, A, hembra y B, macho teñidos en el día embrionario 13,5 con anticuerpos para cadherina-E (rojo) y laminina (verde). Las CGP de ambos sexos expresan elevados niveles de cadherina-E y están organizadas en grupos corticales en el ovario y en cordones internos en los testículos. (De Bendel-Stenzel y col. 2000; microfotografías cortesía de M. Bendel-Stenzel.)

col. 1999). La direccionalidad puede ser proporcionada por un gradiente de proteína soluble.* Evidencia in vitro sugiere que las crestas genitales de embriones de ratón de 10,5 días secretan una proteína difusible tipo TGF-β1 que es capaz de atraer a las CGP de ratón (Godin y col. 1990; Godin y Wylie 1991). Si la cresta genital es capaz de proporcionar tales señales in vivo todavía no ha sido probado experimentalmente.

Aunque no ha sido encontrado plasma germinal en mamíferos, la retención de totipotencialidad ha sido correlacionada con la expresión de un factor de transcripción nuclear, Oct4. Este factor es expresado en todos los núcleos de las blastómeras de segmentación temprana, pero su expresión llega a ser restringida a las células de la masa celular interna. Durante la gastrulación, éste llega a ser expresado únicamente en aquellas células epiblásticas posteriores que se piensa dan origen a las células germinales primordiales. Después de esto, esta proteína se ve solamente en las células germinales primordiales y tardíamente en los ovocitos (fig. 19-9; Yeom y col. 1996; Pesce y col. 1998). (Oct4 no se observa en los espermatozoides en desarrollo después que las células germinales alcanzan los testículos y se comprometen a la producción de espermatozoides.)

La proliferación de las CGP parece ser estimulada por el factor de célula madre, el mismo factor de crecimiento necesario para la proliferación de melanoblastos derivados de la cresta neural y de células madre hematopoyéticas (véase capítulo 6). El factor de célula madre es producido por las células que revisten el camino de migración y se mantiene unido a sus membranas celulares. Parece que la presentación de esta proteína sobre las membranas celulares es importante para su actividad. Los ratones homocigotas para las mutaciones en los genes para el factor de célula madre o su receptor (c-Kit) son deficientes en las células germinales (así como también en los melanocitos y en las células sanguíneas) (véase Dolci y col. 1991; Matsui y col. 1991). El agregado de factor de célula madre a las CGP tomadas de embriones de ratón de 11 días estimula su proliferación por cerca de 24 horas y parece impedir la muerte celular programada que, de otro modo, debería producirse (Godin y col. 1991; Pesce y col. 1993).

* En el pez cebra, las células germinales primordiales parecen seguir un gradiente de la proteína SDF-1, que se conoce es quimioatractante para los linfocitos de mamíferos (Doitsidou y col. 2002).

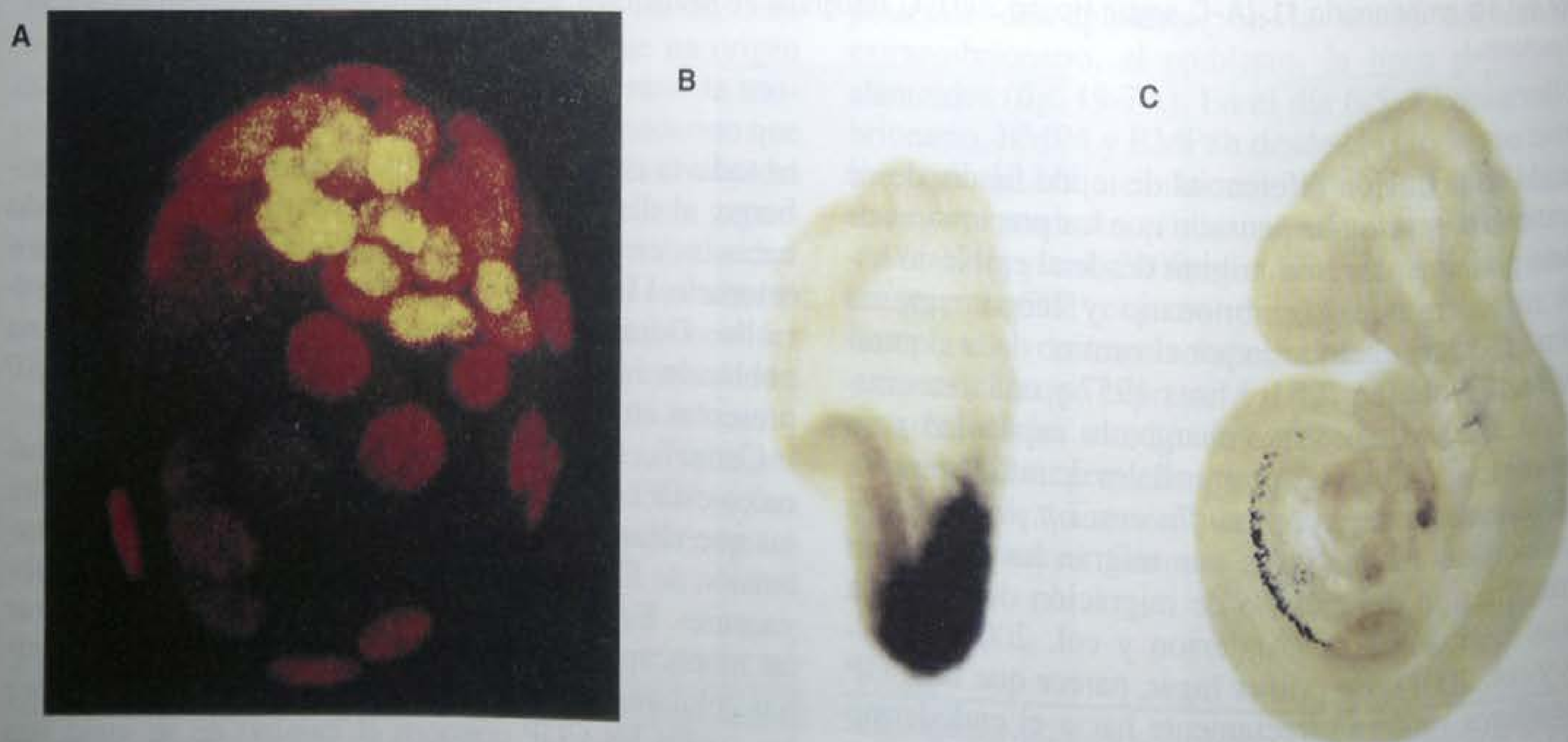
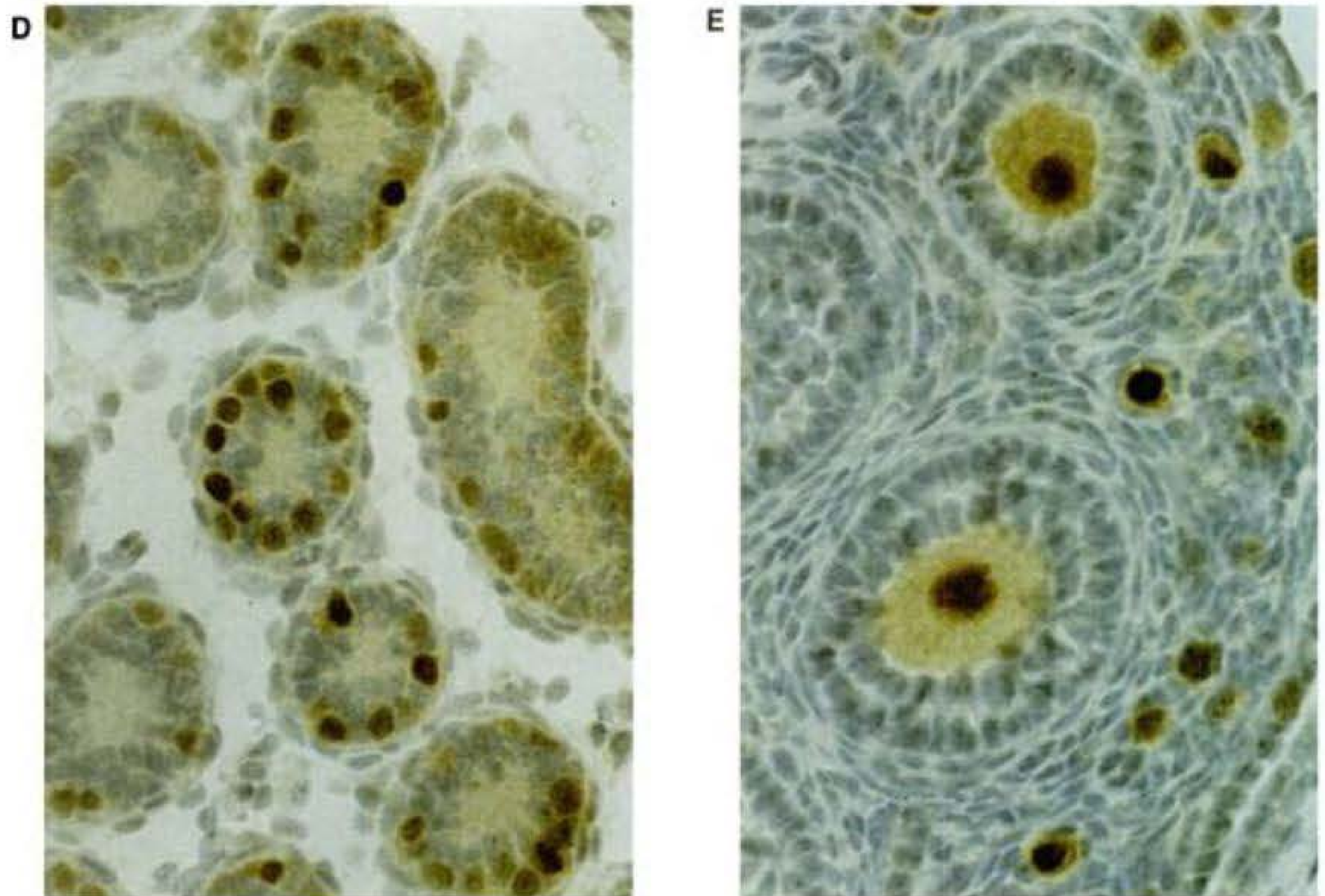


Fig. 19-9. La expresión del mRNA de *Oct4* se correlaciona con la totipotencialidad y la capacidad para formar células germinales. A. El factor de transcripción Oct4 esta teñido de verde con un anticuerpo fluorescente, mientras que todos los núcleos celulares están teñidos de rojo con propidium yodado. La superposición (indicada por el color amarillo) muestra que Oct4 se encuentra solamente en la masa celular interna. B, C. Un transgén *Oct4/lacZ* dirigido por la región promotora de *Oct4* muestra su expresión (color oscuro), B, en el epiblasto posterior de un embrión de ratón de 8,5 días y C, en CGP en migración en un embrión de 10,5 días.

Fig. 19-9. *(Cont.)* **D**, **E**. La tinción de anticuerpos (marrón) muestra a la proteína Oct4 en los núcleos de **D**, la ovogonia de ovarios posnatales y **E**, las espermatogonias en testículos posnatales. (**A-C**, según Yeom y col. 1996; **D**, **E**, de Pesce y col. 1998; microfotografías cortesía de H. R. Schöler.)



Información adicional y especulaciones

Células GE, células ME y teratocarcinomas

Células germinales embrionarias (GE)

El factor de célula madre aumenta en cultivo la proliferación de las células germinales primordiales del ratón en migración, y su proliferación puede ser aumentada mucho más mediante el agregado de otro factor de crecimiento, el factor de inhibición de la leucemia (FIL). Sin embargo, el tiempo de vida de estas CGP es corto y las células mueren rápidamente. Pero si se agrega un regulador mitótico adicional –factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2)–, tiene lugar un sorprendente cambio. Las células continúan proliferando, produciendo células madre embrionarias pluripotentes con características que se asemejan a las de la masa celular interna (Matsui y col. 1992; Resnik y col. 1992; Rohwedel y col. 1996). Estas células derivadas de la CGP son denominadas **células germinales embrionarias (GE)**, y tienen el potencial para diferenciarse hacia todos los tipos celulares del cuerpo.

En 1998, el laboratorio de John Gearhart (Shamblott y col. 1998) cultivó células GE humanas. Estas células fueron capaces de generar células diferenciadas a partir de las tres capas germinales primarias y son presumiblemente totipotentes. Tales células pueden ser utilizadas médicamente para crear células madre neurales o hematopoyéticas, que podrían ser utilizadas para regenerar tejidos neurales o sanguíneos dañados (véase capítulo 4). Las células GE son a menudo consideradas células madre embrionarias (ME) y se ignora la distinción de su origen.

Células madre embrionarias (ME)

Las células madre embrionarias (ME) fueron descritas en el capítulo 4; estas células son derivadas de la masa celular interna. Las células ME y GE pueden ser transfectadas con genes recombinantes e insertadas en blastocistos para crear ratones transgénicos. Tal célula germinal de mamífero o célula madre contiene dentro de ésta toda la información necesaria para el posterior desarrollo.

¿Qué podría suceder si una de estas células se vuelve maligna? En un tipo de tumor, las células germinales se convierten en células madre embrionarias, como las CGP tratadas con FGF2 en los experimentos anteriores. Este tipo de tumor se denomina **teratocarcinoma**. Sea producido espontánemente o experimentalmente, un teratocarcinoma contiene una población de células madre indiferenciadas que tienen propiedades bioquímicas y de desarrollo sorprendentemente similares a las de la masa celular interna (Graham 1977). Además, estas células madre no solo se dividen, sino que también pueden diferenciarse hacia una amplia variedad de tejidos, incluyendo epitelio intestinal y respiratorio, músculo, tejido nervioso, cartílago y hueso (fig. 19-10). Una vez diferenciadas, estas células no se dividen más y por esta razón no son más malignas. Tales tumores pueden dar origen a la mayoría de los distintos tipos de tejidos del cuerpo. Por lo tanto, las células madre del teratocarcinoma imitan el desarrollo temprano de los mamíferos, pero el tumor que ellas forman está caracterizado por un desarrollo azaroso.

En 1981, Stewart y Mintz formaron un ratón desde células derivadas en parte de una célula madre de teratocarcinoma. Las células madre que se habían originado en un teratocarcinoma de una cepa agouti (punteado amarillo) de ratón fueron cultivadas por varias generaciones celulares y se vio que mantenían el complemento

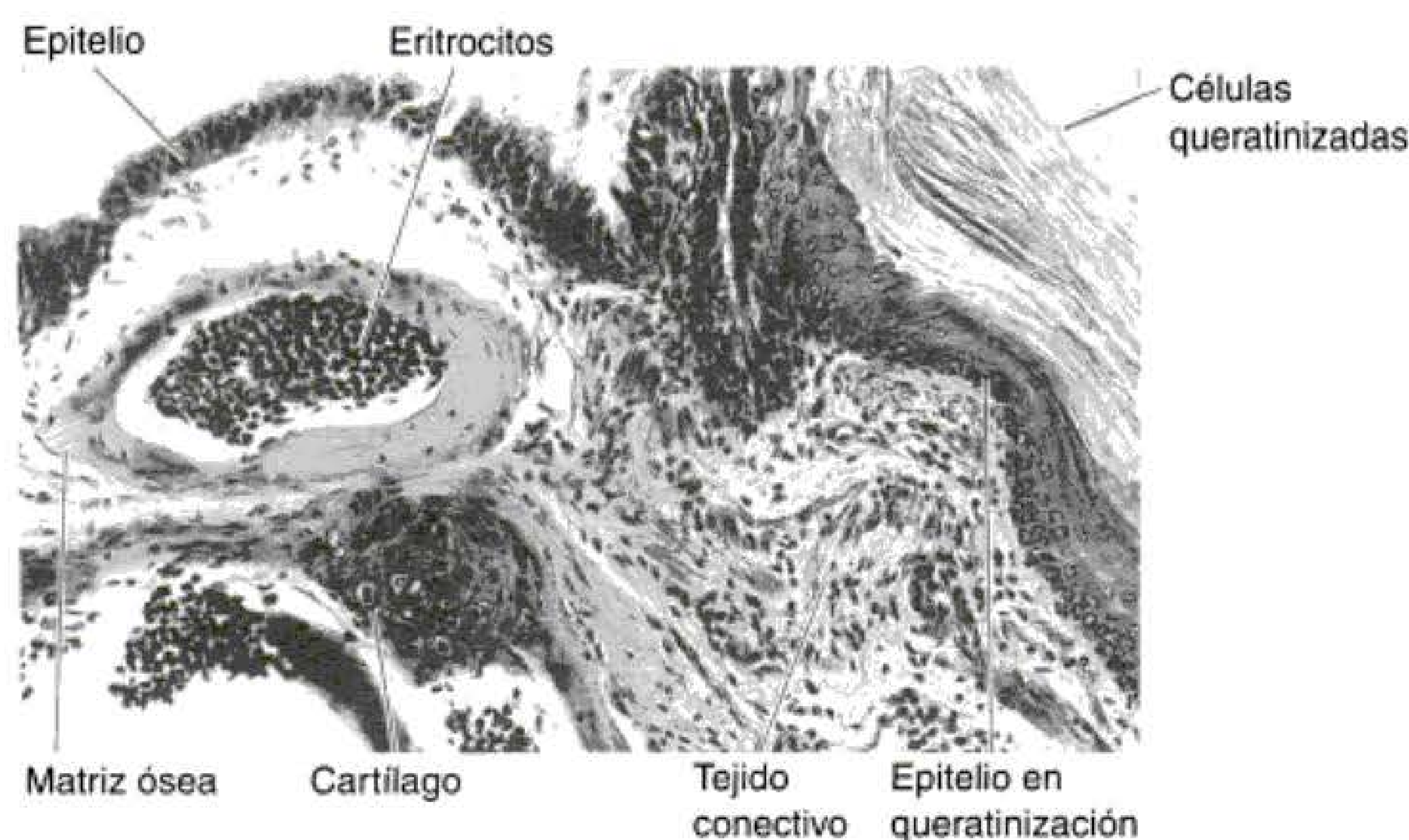


Fig. 19-10. Microfotografía de una sección a través de un teratocarcinoma, que muestra numerosos tipos celulares diferenciados. (De Gardner 1982; fotografía por C. Graham, cortesía de R. L. Gardner.)

cromosómico característico del ratón progenitor. Células madre individuales dependientes del tumor fueron inyectadas hacia blastocistos de ratones de pelaje negro. Los blastocistos luego fueron transferidos hacia el útero de una madre adoptiva y nacieron ratones vivos. Algunos de estos ratones tenían pelajes de dos colores, lo que indica que la célula del tumor se había integrado en el embrión. Esto, en sí mismo, es una sorprendente demostración de que el contexto tisular es crítico para el fenotipo de una célula –una célula maligna fue hecha no maligna.

Pero la historia no termina aquí. Cuando estos ratones quiméricos fueron apareados con ratones que transportaban alelos recesivos de los de la célula tumoral original, los alelos de la célula tumoral se expresaron en muchas de las crías. Esto significa que la célula tumoral originalmente maligna había producido muchos, sino todos, tipos de células somáticas normales e incluso había producido células germinales funcionales normales! Cuando tales ratones (siendo heterocigotas para los genes de la célula tumoral) fueron apareados entre sí, la camada resultante contenía ratones que eran homocigotas para un gran número de genes de la célula tumoral (fig. 19-11).

Fig. 19-11. Protocolos para la cría de ratones cuyos genes son derivados en gran parte de células tumorales. Las células madre son aisladas de un teratocarcinoma de ratón e insertadas en blastocistos de una cepa de ratón diferente. Los blastocistos quiméricos son implantados en una madre adoptiva. Si las células tumorales se integran en un blastocisto, el ratón que se desarrolla tendrá muchas de sus células derivadas del tumor. Si el tumor ha dado origen a células germinales, el ratón quimérico puede ser apareado con un ratón normal para producir una generación F_1. El ratón F_1 debería ser heterocigota para todos los cromosomas de la célula tumoral. Los apareamientos entre ratones F_1 deberían producir ratones F_2 homocigotas para algunos genes derivados del tumor, y los ratones F_2 deberían expresar muchos genes de la célula tumoral. (Según Stewart y Mintz 1981.)

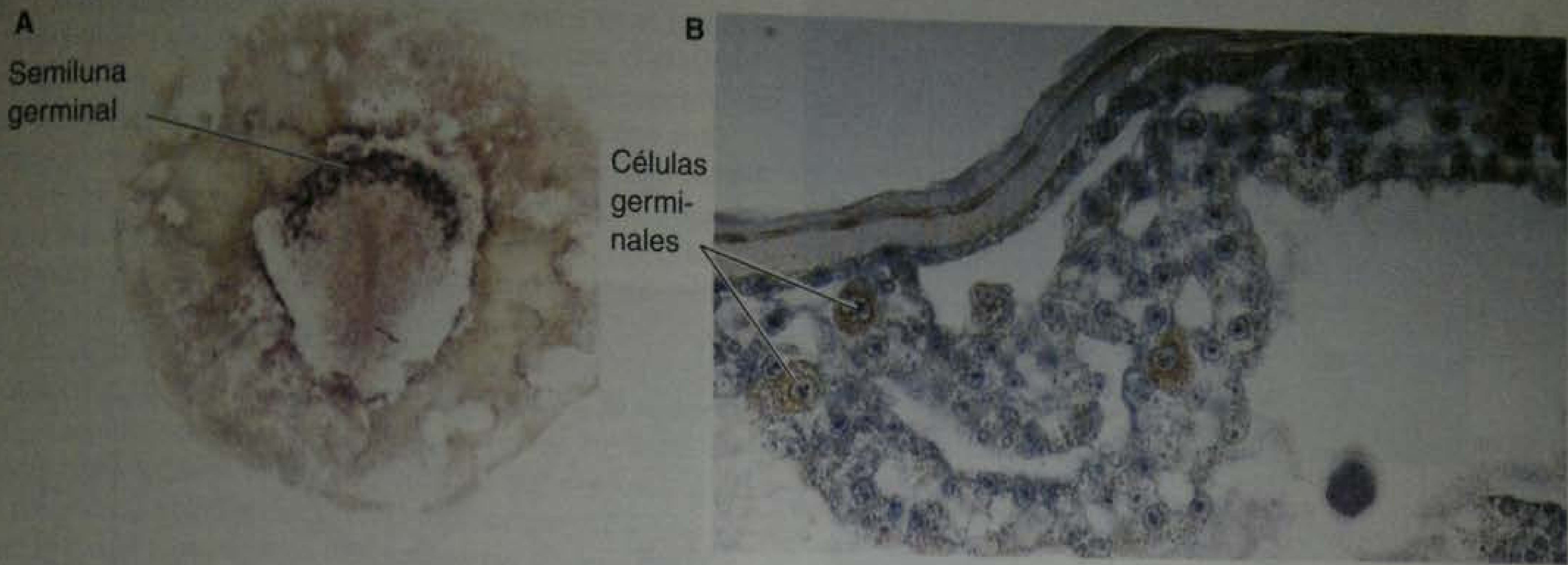


Fig. 19-12. Semiluna germinal del embrión de pollo. A. Células germinales de un embrión de pollo en estadio de línea primitiva definitiva (estadio 4, aproximadamente 18 horas), teñidas (violeta) para la proteína homóloga de pollo Vasa. Las células teñidas están limitadas a la semiluna geminal. B. Mayores aumentos de la región de la semiluna germinal en el estadio 4, que muestra a las células germinales (teñidas de marrón) en el epiblasto engrosado. (Anterior es a la derecha.) (De Tsunekawa y col. 2000; microfotografías cortesía de N. Tsunekawa.)

Migración celular germinal en aves y reptiles

En aves y reptiles, las células germinales primordiales son derivadas de las células epiblásticas que migran desde la región central del área pelúcida hacia una zona de forma de semiluna en el hipoblasto, en el borde anterior del área pelúcida (fig. 19-12; Eyal-Giladi y col. 1981; Ginsburg y Eyal-Giladi 1987). Esta región extraembrionaria es denominada la **semiluna germinal** y allí se multiplican las células CGP.

A diferencia de las CGP de anfibios y mamíferos, las de aves y reptiles migran primariamente hacia las gónadas por medio del torrente sanguíneo (fig. 19-13). Cuando se forman los vasos sanguíneos en la semiluna germinal, las CGP ingresan en aquellos vasos y son transportadas por la circulación hacia la región donde se está formando el intestino posterior. Aquí ellas dejan la circulación, se asocian con el mesenterio y migran hacia las crestas genitales (Swift 1914; Mayer 1964; Kuwana 1993; Tsunekawa y col. 2000).

Las CGP de la semiluna germinal parecen ingresar a los vasos sanguíneos mediante **diapédesis**, un tipo de movimiento ameboideo común a linfocitos y macrófagos que le permite a las células meterse entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos pequeños. De algún modo todavía no descubierto, las CGP son instruidas a salir de los vasos sanguíneos e ingresar en las gónadas (Pasteels 1953; Dubois 1969). La evidencia para la quimiotaxis viene de estudios (Kuwana y col. 1986) en los que las CGP del pollo en circulación fueron aisladas de la sangre y cultivadas entre los rudimentos gonadales y otros tejidos embrionarios. Las CGP migraban específicamente hacia los rudimentos gonadales durante las 3 horas de incubación.

Migración de la célula germinal en Drosophila

Durante la embriogénesis de *Drosophila*, las células germinales primordiales se mueven desde el polo posterior hacia las gónadas de un modo similar al de las células germinales de mamíferos (fig. 19-14). La primera etapa en esta migración es pasiva, por medio de la cual 30 o 40 células polares son desplazadas hacia el intestino medio posterior por los movimientos de la gastrulación. En la segunda etapa, el endodermo del intestino desencadena diapédesis activa en las CGP, que viajan a través del extremo ciego del intestino medio posterior, y migran hacia el mesodermo visceral. En la tercera etapa, las CGP se separan en dos grupos, cada uno de los cuales se asociará con un primordio gonadal en desarrollo.

En la cuarta etapa, las CGP migran hacia las gónadas, que son derivadas del mesodermo lateral de los parasegmentos 10-12 (Warrior 1994; Jaglarz y Howard 1995; Broihier y col. 1998). Esta etapa involucra atracción y repulsión. El producto del gen *wunen* parece ser responsable de dirigir la migración de las CGP del endodermo hacia el mesodermo. Esta proteína es expresada en el endodermo inmediatamente antes de la migración de la CGP, y repele a las CGP. En los mutantes de pérdida de función de este gen, las CGP deambulan azarosamente (Zhang y col. 1997). Dos proteínas parecen ser críticas para la atracción de las CGP de la *Drosophila* hacia las gónadas. Una es el producto del gen *columbus*, el otro es Hedgehog (Moore y col. 1998; Van Doren y col. 1998; Deshpande y col. 2001). Estas proteínas son producidas en las células mesodérmicas de las gónadas. En los mutantes de pérdida de función de cada gen, las CGP deambulan azarosamente desde el endoermo y si cada gen es expresado en otro tejido (como el cordón neural), aquellos tejidos atraerán a las CGP. En la última etapa, la gónada coalesce alrededor de las células germinales para dividirse y madurar hacia gametos.

Meiosis

Una vez en la gónada, las células germinales primordiales continúan dividiéndose mitóticamente y producen millones de precursores de gametos potenciales. Las células germinales de las gónadas de machos y hembras luego se enfrentan con la necesidad de reducir sus cromosomas desde la condición diploide a la haploide. En la

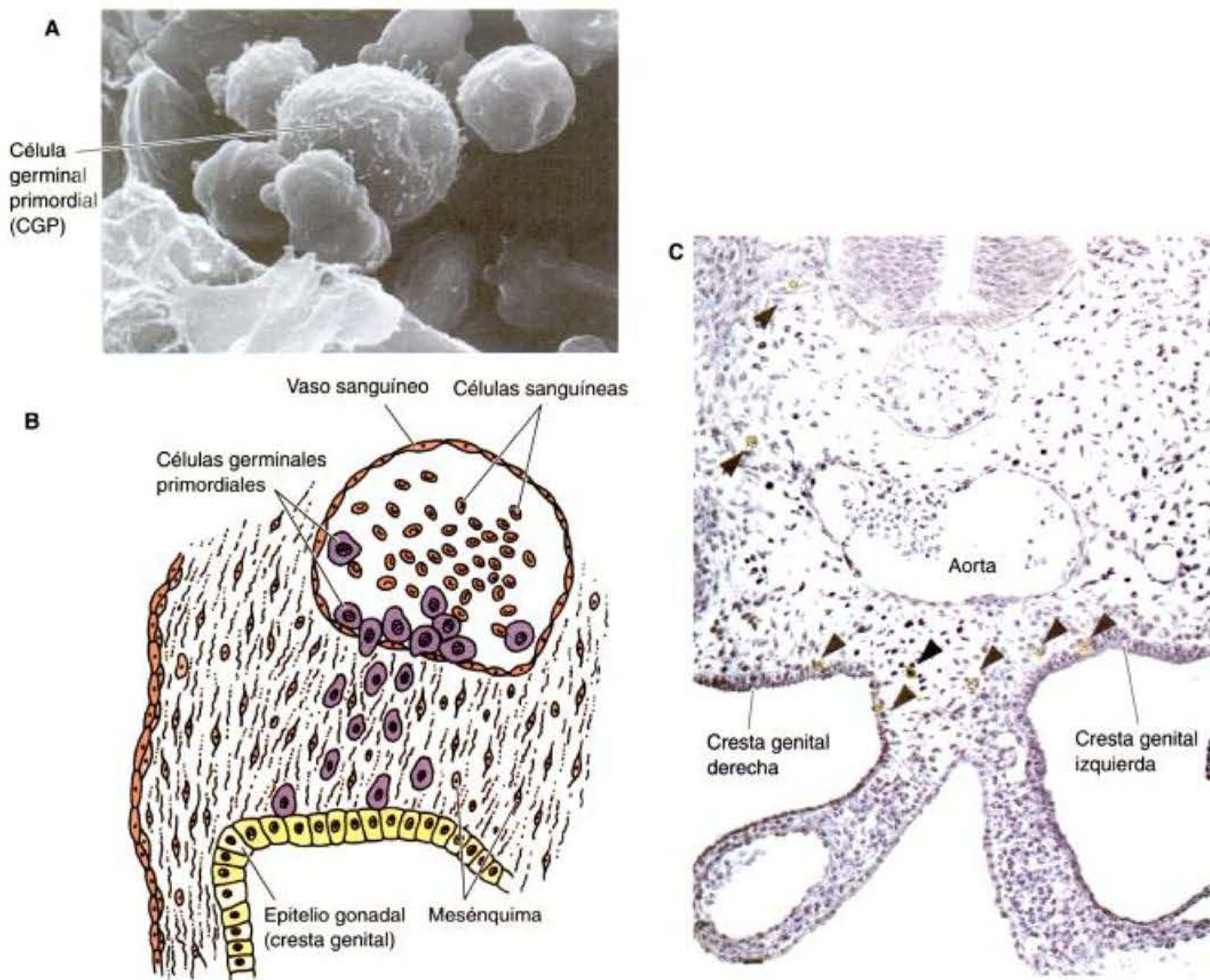


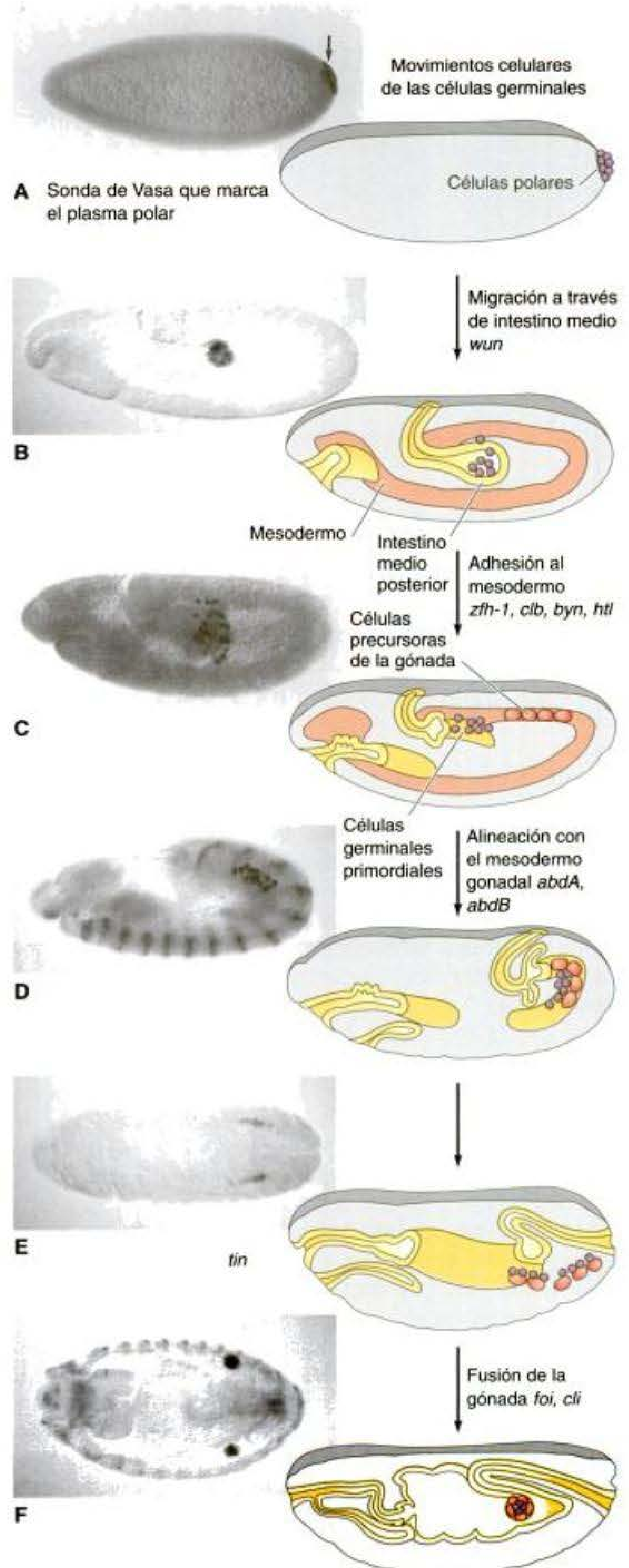
Fig. 19-13. Migración de las células germinales primordiales en el embrión de pollo. **A.** Microfotografía electrónica de barrido de una CGP de pollo en un capilar de un embrión gastrulando. La CGP puede ser identificada por su gran tamaño y por las microvellosidades sobre su superficie. **B.** Esquema de una sección transversal cerca de la región gonadal prospectiva de un embrión de pollo. Varias CGP dentro de un vaso sanguíneo se agrupan cerca del epitelio gonadal. Una CGP está cruzando a través del endotelio del vaso sanguíneo y otra CGP ya se encuentra localizada adyacente al epitelio gonadal. **C.** Habiendo pasado a través del endotelio de la aorta dorsal, las células germinales del pollo (cabezas de flecha) migran hacia las crestas genitales del embrión. (**A**, de Kuwana 1993, cortesía de T. Kuwana; **B**, según Romanoff 1960; **C**, de Tsunekawa y col. 2000, cortesía de N. Tsunekawa.)

condición haploide, cada cromosoma está representado únicamente por una copia, mientras que las células diploides tienen dos copias de cada cromosoma. Para llevar a cabo esta reducción, las células germinales experimentan **meiosis**. La meiosis difiere de la mitosis en que: 1) las células meióticas experimentan dos divisiones celulares sin un período interpuesto de replicación del DNA, y 2) los cromosomas homólogos (cada uno consistiendo en dos cromátidas hermanas unidas en el cinetocoro) se aparean y recombinan el material genético. La meiosis está, por esta razón, en el centro de la reproducción sexual. Como Villeneuve y Hillers (2001) concluyeron, "la esencia misma del sexo es la recombinación meiótica." Aunque todo está centrado en la genética, el desarrollo y la evolución, se sabe sorprendentemente poco sobre la meiosis.

Después de la última división mitótica de la célula germinal, se produce un período de síntesis de DNA, de modo tal que la célula que inicia la meiosis duplica la cantidad de DNA en su núcleo. En este estado, cada cromosoma consiste en dos **cromátidas** hermanas unidas a un cinetocoro común (centrómero). (En otras palabras, el núcleo diploide contiene cuatro copias de cada cromosoma.) La meiosis, mostrada en la figura 2-11, implica dos divisiones celulares. En la primera división, los cromosomas homólogos (por ejemplo, el par cromosómico 3 en la célula diploide) se reúnen y se separan después en células diferentes. Por lo tanto, la primera división meiótica separa los cromosomas homólogos entre las dos células hijas de modo que cada célula posee solamente una copia de cada cromosoma. Pero cada uno de los cromosomas se había replicado (es decir, cada uno tiene dos cromátidas). La segunda división meiótica, entonces, separa una cromátida de la otra cromátida hermana. Consecuentemente, cada una de las cuatro células producidas por meiosis tiene una sola copia (haploide) de cada cromosoma.

La primera división meiótica comienza con una larga profase, que es subdividida en cinco estadios. Durante el estadio de **leptoteno** (del griego, "hilo delgado"), la cro-

Fig. 19-14. Migración de las células germinales en el embrión de *Drosophila*. La columna de la izquierda muestra el plasma germinal teñido por anticuerpos para Vasa, un componente proteico del plasma germinal (D ha sido contrateñido con anticuerpos para la proteína Engrailed para mostrar la segmentación, y E y F son vistas dorsales.) La columna derecha esquematiza los movimientos de las células germinales. **A.** Las células germinales se originan del plasma polar en el extremo posterior del huevo. **B.** Los movimientos pasivos llevan a las CGP hacia el intestino medio posterior. **C.** Las CGP se mueven a través del endodermo y hacia el mesodermo visceral caudal por diapédesis. El producto del gen *wunen* (*wun*) expresado en las células endodérmicas expulsa a las CGP, mientras que el producto del gen *columbus* (*clb*) expresado en el mesodermo caudal las atrae. **D-F.** Los movimientos del mesodermo llevan a las CGP hacia la región del décimo segmento a través del duodécimo, donde el mesodermo se une alrededor de ellas para formar las gónadas. (Microfotografías de Warrior y col. 1994, cortesía de R. Warrior; esquema según Howard 1998.)



matina de las cromátidas se estira hasta adoptar una apariencia muy delgada resultando imposible identificar a los cromosomas individuales. Sin embargo, la replicación del DNA ya se ha producido, y cada cromosoma consiste en dos cromátidas paralelas. En el estadio de **cigoteno** (del griego, "hilos acoplados"), los cromosomas homólogos se aparean en toda su extensión. Este apareamiento es denominado **sinapsis** y es característico de la meiosis. Este apareamiento no se produce durante las divisiones mitóticas. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual cada cromosoma reconoce su homólogo, la sinapsis parece requerir de la presencia de la membrana nuclear y de la formación de una cinta proteinácea denominada **complejo sinaptonémico**. Este complejo es una estructura escaleriforme con un elemento central y dos barras laterales (von Wettstein 1984; Schmekel y Daneholt 1995). La cromatina llega a estar asociada con las dos barras laterales y los cromosomas están de este modo unidos (fig. 19-15B). Los exámenes de los núcleos de las células meióticas con el microscopio electrónico (Moses 1968; Moens 1969) sugieren que los cromosomas apareados están unidos a la membrana nuclear y Comings (1968) ha sugerido que la envoltura nuclear ayuda a reunir a los cromosomas homólogos. La configuración formada por las cuatro cromátidas y el complejo sinaptonémico es referida como una **tétrada** o **bivalente**.

Durante la siguiente fase de la profase meiótica, las cromátidas aumentan su grosor y se acortan. Este estadio, por esta razón, ha sido denominado **paquiteno** (del griego, "hilo grueso"). Las cromátidas individuales ahora pueden ser distinguidas bajo el microscopio de luz y se puede producir el entrecruzamiento (*crossing-over*). El **entrecruzamiento** representa un intercambio de material genético por medio del cual los genes de una cromátida son intercambiados con los genes homólogos de otra. El entrecruzamiento puede continuar en el siguiente estadio, el estadio de **diploteno** (del griego, "hilos dobles"). Aquí, el complejo sinaptonémico se destruye y los dos cromosomas homólogos comienzan a separarse. Sin embargo, a menudo se observa que se mantienen unidos en varios puntos denominados **quiasmas**, que se piensa representan a regiones donde se está produciendo el entrecruzamiento (fig. 19-15C). El estadio de diploteno está caracterizado por un alto nivel de transcripción génica. En algunas especies, los cromosomas de las células germinales del macho y de la hembra toman la apariencia

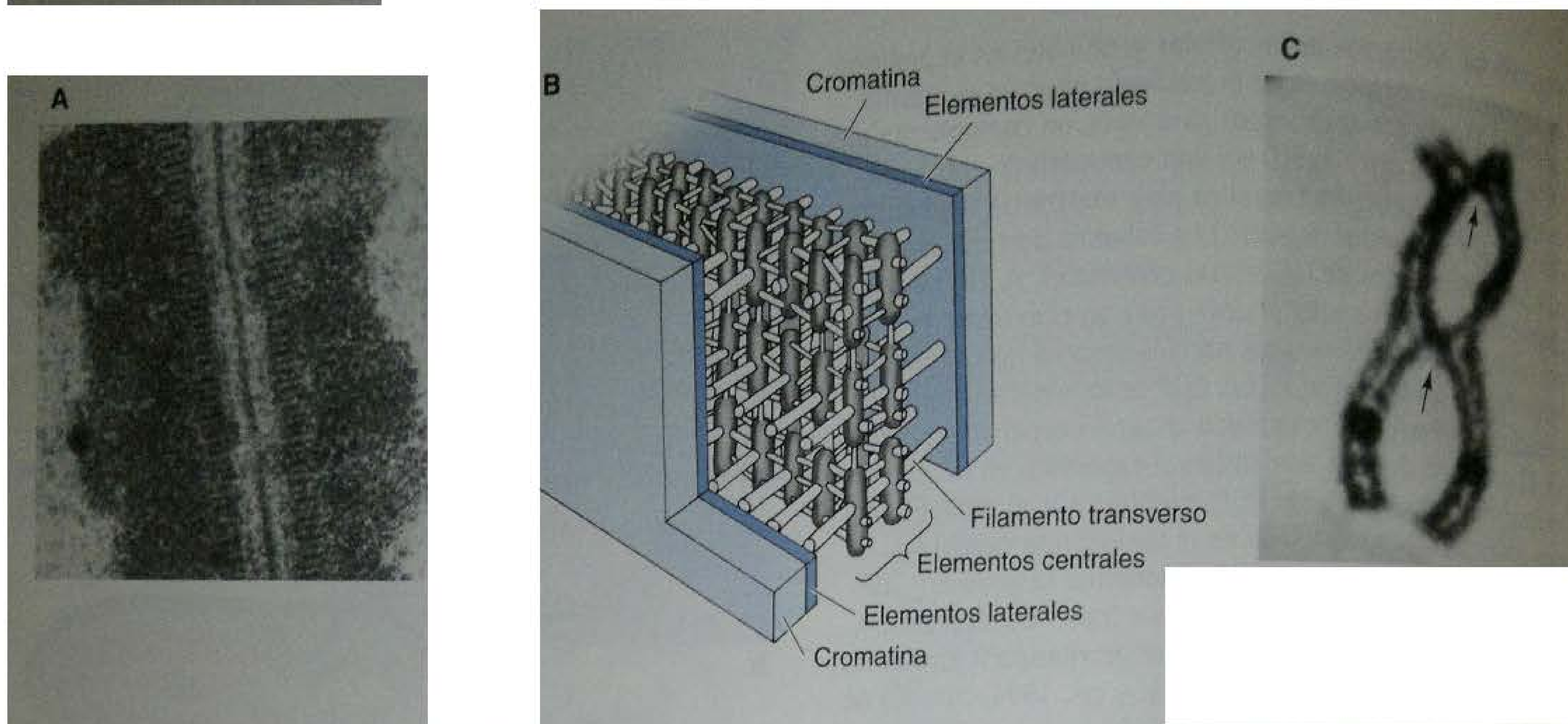


Fig. 19-15. El complejo sinaptonémico y la recombinación. **A.** Los cromosomas homólogos se mantienen unidos en la primera profase meiótica en un ovocito de *Neottiella*. **B.** Esquema interpretativo de la estructura del complejo sinaptonémico. **C.** Quiasmas en cromosomas bivalentes en diploteno de ovocitos de salamandra. Los cinetocoros son visibles como círculos de tinción oscura; las flechas indican los dos quiasmas. (A, de von Wettstein 1971, cortesía de D. von Wettstein; B, según Schmekel y Daneholt 1995; C, fotografía cortesía de J. Kezer.)

característica en "escobilla" de los cromosomas que están produciendo activamente RNA (véase más abajo). Durante el siguiente estadio, la **diacinesis** (del griego, "separándose"), los cinetocoros se separan uno del otro y los cromosomas se mantienen unidos solamente en los extremos de las cromátidas. Este último estadio de la profase meiótica finaliza con la ruptura de la membrana nuclear y la migración de los cromosomas hacia la **placa metafásica**.

Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se separan entre sí de una manera independiente. Este estadio lleva a la telofase I, durante la cual se forman dos células hijas, cada una contiene un componente de cada par de cromosomas homólogos. Después de una breve **intercinesis**, tiene lugar la segunda división meiótica. Durante esta división, los cinetocoros de cada cromosoma se dividen durante la anafase de modo tal que cada una de las nuevas células recibe una de las dos cromátidas, siendo el resultado final la creación de cuatro células haploides. Nótese que la meiosis también ha redistribuido los cromosomas en nuevas reagrupaciones. En primer lugar, cada una de las cuatro células haploides tiene una colección diferente de cromosomas. En humanos, en los que hay 23 pares diferentes de cromosomas, se pueden formar 2^{23} (casi 10 millones) tipos diferentes de células haploides a partir del genoma de una única persona. Además, el entrecruzamiento que se produce durante los estadios de paquiteno y de diploteno de la profase I aumenta aún más la diversidad genética y hace incalculable el número de gametos diferentes.

Si la meiosis es el centro de la reproducción sexual y la reproducción sexual predomina entre los reinos eucarióticos, entonces la meiosis debe ser uno de los temas centrales que unifican la vida. El estudio de la meiosis está siendo facilitado por la observación de que casi todos los genes y proteínas utilizados en la meiosis de levadura también funcionan en la meiosis de mamíferos. Esta observación ha permitido la identificación de un "centro meiótico del complejo de recombinación" que es utilizado por plantas, hongos y animales. Este complejo de recombinación se construye sobre la columna vertebral del **complejo cohesina**, la proteína adhesiva que mantiene juntas a las cromátidas hermanas durante la profase y la metafase *mitótica*. En las células meióticas, este complejo recluta otro grupo de proteínas que están involucradas en promover el apareamiento entre los cromosomas homólogos y en permitir que se produzca la recombinación (Pelttari y col. 2001; Villeneuve y Hillers 2001). Estas proteínas que inducen recombinación están involucradas en la producción y reparación de las roturas de la doble cadena de DNA.

Aunque no es clara la relación entre el complejo sinaptonémico y el complejo de recombinación cohesina-reclutado, parece que en mamíferos el complejo sinaptonémico estabiliza las asociaciones iniciadas por el complejo de recombinación, dando un andamiaje morfológico a las endebles conexiones proteínicas (Pelttari y col. 2001). Si el complejo sinaptonémico fracasa en formarse, las células germinales se detienen en el estadio de paquiteno y sus cromosomas se fragmentan (fig. 19-16). Si se forma el complejo sinaptonémico murino pero carece de ciertas proteínas, fracasa la formación del quiasma y las células germinales son a menudo aneuploides, teniendo múltiples copias de uno o más cromosomas (Tay y Richter 2001; Yuan y col. 2002).

Los acontecimientos de la meiosis parecen ser coordinados a través de las conexiones citoplasmáticas entre las células en división. Mientras que las células hijas formadas por mitosis rutinariamente se separan entre sí, los productos de las divisiones celulares meióticas se mantienen acoplados entre sí mediante **puentes citoplasmáticos**. Estos puentes se observan durante la formación de los espermatozoides y de los gametos femeninos en todo el reino animal (Pepling y Spradling 1998).

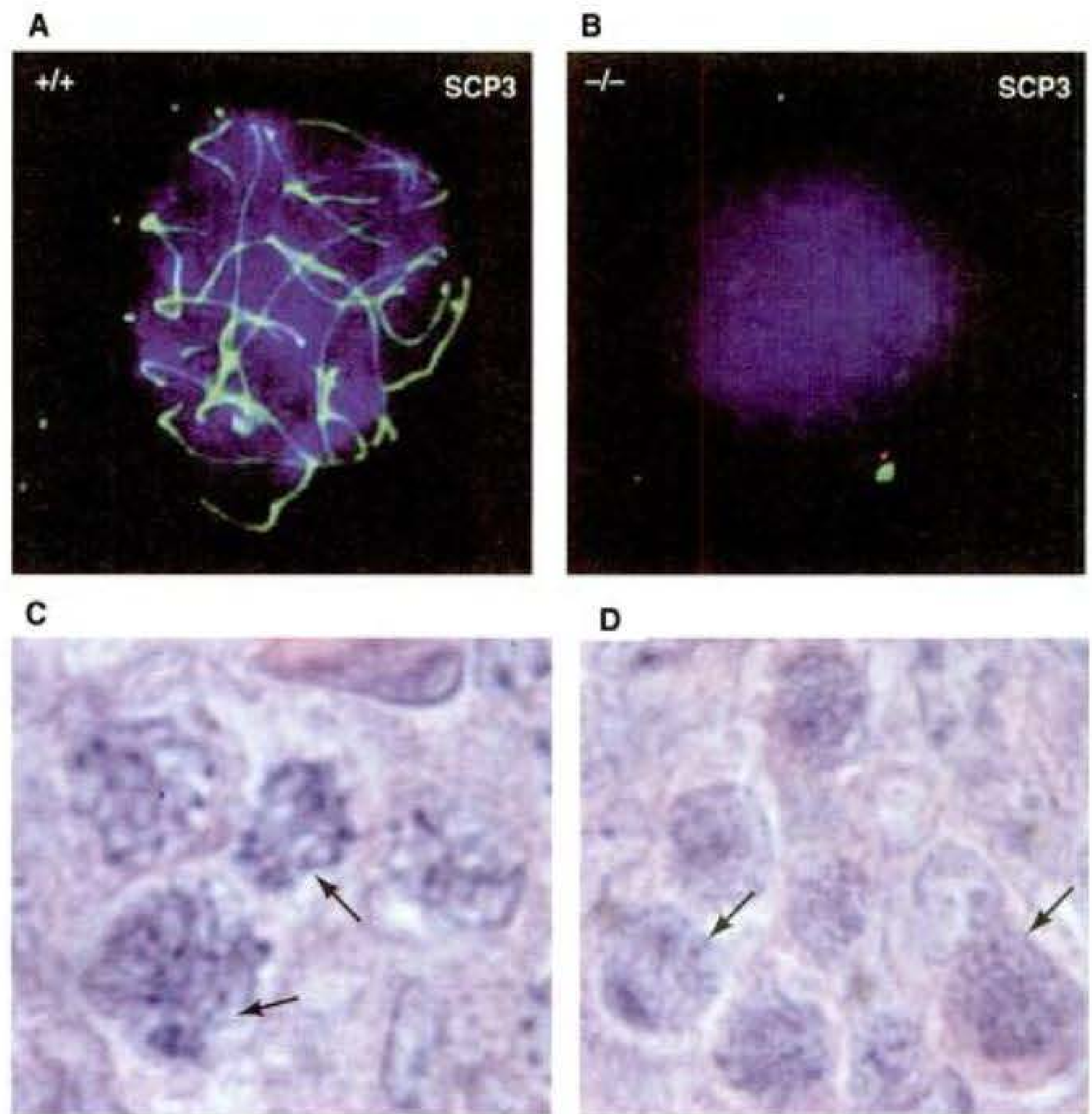


Fig. 19-16. Importancia del complejo sinaptonémico. La proteína CPEB es un constituyente del complejo sinaptonémico y cuando se realiza el knockout de este gen en ratones, no se forma el complejo sinaptonémico. **A, B.** Tinciones para las proteínas del complejo sinaptonémico en ratones tipo salvaje (**A**) y deficientes de CPEB (**B**). El complejo sinaptonémico está teñido de verde, el DNA está teñido de azul. El complejo sinaptonémico está ausente en los núcleos mutantes y su DNA no está organizado en cromosomas diferenciados. **C, D.** En preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, se puede ver que el DNA está en el estadio de paquitene en las células tipo salvaje (**C**) y fragmentado en las células mutantes (**D**). (Según Tay y Richter 2001; microfotografías cortesía de J. D. Richter.)

SITIO WEB 19.3 **Proteínas involucradas en la meiosis (Proteins involved in meiosis).** El fenómeno del apareamiento homólogo y del entrecruzamiento está siendo analizado en varios organismos y puede involucrar a enzimas que reparan el DNA.

SITIO WEB 19.4 **Meiosis humana (Human meiosis).** La no disyunción, el fracaso de los cromosomas para segregarse apropiadamente durante la meiosis, no es poco frecuente en los seres humanos. Su frecuencia se incrementa con la edad materna.

Información adicional y especulaciones

Grandes decisiones: ¿mitosis o meiosis? ¿Espermatozoide o gameto femenino?

En muchas especies, las células germinales en migración hacia la gónada son bipotenciales y pueden diferenciarse a espermatozoides o a gametos femeninos, dependiendo de su ambiente gonadal. Cuando los ovarios de las salamandras son transformados experimentalmente en testículos, las células germinales residentes detienen su diferenciación ovogénica y comienzan a desarrollarse como espermatozoides (Burns 1930; Humphrey 1931). De modo semejante, en la mosca doméstica y en el ratón, la gónada es capaz de dirigir la diferenciación de las células germinales (McLaren 1983; Inoue y Hiroyoshi 1986). Por lo tanto, en la mayoría de los organismos, el sexo de la gónada y el de sus células germinales es el mismo.

Pero ¿qué sucede con los animales hermafroditas, en los que el cambio de producción de espermatozoides a la producción de gametos femeninos es un acontecimiento fisiológico que se produce naturalmente? ¿Cómo es el mismo animal capaz de producir espermatozoides durante una parte de su vida y ovocitos durante otra parte? Al utilizar *Caenorhabditis elegans*, Kimble y sus colegas identificaron dos "decisiones" que presuntamente tienen que tomar las células germinales. La primera es si entran en meiosis o se mantienen como célula madre dividiéndose mitóticamente. La segunda es si se convierten en un gameto femenino o en un espermatozoide.

Evidencia reciente demuestra que estas decisiones están íntimamente relacionadas. La decisión mitótica/meiótica está controlada por una única célula en el extremo de cada gónada que no se divide, la **célula del extremo distal**. Los precursores celulares germinales cerca de esta célula se dividen mitóticamente, formando el fondo común de células germinales; pero a medida que estas células se alejan cada vez más de la célula del extremo distal, entran en meiosis. Si la célula del extremo distal es destruida por un haz de láser enfocado, todas las células germi-

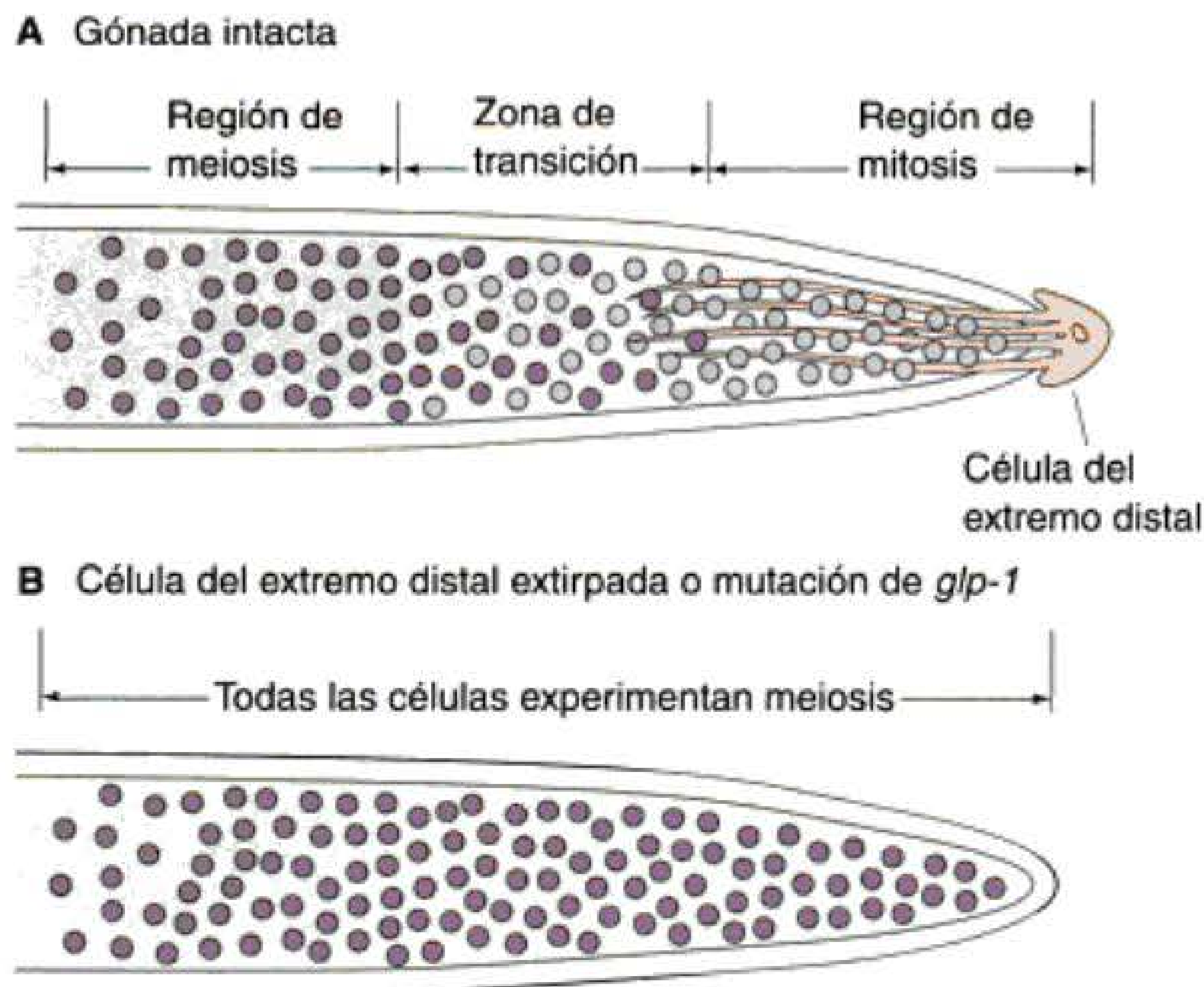


Fig. 19-17. Regulación de la decisión de mitosis-o-meiosis por las células del extremo distal de la ovotestis de *C. elegans*. **A.** Gónada intacta en el desarrollo temprano con regiones de mitosis (células de coloración clara) y meiosis. La membrana de las extensiones de la célula del extremo distal contiene un homólogo de *C. elegans* de la proteína Delta, mientras que las CGP contienen un homólogo de *C. elegans* de Notch. **B.** Gónada después de la ablación de la célula del extremo distal o de la mutación del gen *glp-1*. Todas las células germinales entran en meiosis.

nales entran en meiosis, y si la célula del extremo distal es colocada en la gónada en una localización diferente, las células madre de la línea germinal son generadas cerca de esta nueva posición (fig. 19-17; Kimble 1981; Kimble y White 1981). La célula del extremo distal extiende largos filamentos que tocan a las células germinales distales. Las extensiones contienen en sus membranas celulares la proteína Lag-2, un homológo de Delta de *C. elegans* (Henderson y col. 1994; Tax y col. 1994; Hall y col. 1999). La proteína Lag-2 mantiene a las células germinales en mitosis e inhibe su diferenciación meiótica.

Austin y Kimble (1987) aislaron una mutación que imita el fenotipo obtenido cuando es extirpada la célula distal. No es sorprendente que esta mutación involucre al gen que codifica GLP-1, el homólogo de Notch de *C. elegans* –el receptor para Delta. Todos los precursores de la célula germinal de nematodos homocigotas para la mutación recesiva de *glp-1* inician la meiosis, sin dejar población mitótica. En lugar de las 1.500 células germinales frecuentemente halladas en el cuarto estadio larval del desarrollo hermafrodítico, estos mutantes producen solo 5 a 8 células de espermatozoides. Cuando se producen quimeras genéticas en las que los precursores celulares germinales tipo salvaje son halladas dentro de una larva mutante, las células tipo salvaje son capaces de responder a las células del extremo distal y experimentar la mitosis. Sin embargo, cuando los precursores celulares germinales mutantes son hallados dentro de la larva tipo salvaje, todas ellas entran en meiosis. Por lo tanto, el gen *glp-1* parece ser responsable de permitir a las células germinales responder a la señal de la célula del extremo distal.* Una vez que las células germinales comienzan sus divisiones meióticas, todavía deben convertirse en espermatozoides o gametos femeninos. Generalmente, en cada gónada hermafrodita (denominada ovotestis), las células germinales más proximales producen espermatozoides, mientras que las más distales (cerca del extremo) se convierten en gametos femeninos (Hirsh y col. 1976). Esto significa que las células germinales que ingresan temprano en la meiosis se convierten en espermatozoides, mientras que las que entran en la meiosis tardíamente se convierten en gametos femeninos. La genética de este cambio esta siendo actualmente analizada. Los laboratorios de Hodgkin (1985) y Kimble (Kimble y col. 1986) han aislado a varios genes necesarios para la selección de la vía de la célula germinal, pero el cambio parece involucrar la actividad o inactividad del mRNA de *fem-3*. La figura 19-18 presenta un esquema sobre cómo podrían funcionar estos genes. Durante el desarrollo temprano, los genes *fem*, especialmente *fem-3*, son críticos para la especificación de las células espermáticas. Las mutaciones de pérdida de función de estos genes convierten a los nematodos XX en hembras (es decir, hermafroditas sin espermatozoides). Mientras que las proteínas FEM sean producidas en las células germinales, se producen espermatozoides. Se piensa que la proteína FEM activa a los genes *fog* (cuyas mutaciones de pérdida de función causan la feminización de la línea germinal y eliminan la espermatogénesis). Los productos del gen *fog* activan a los genes involucrados en la transformación de la célula germinal hacia espermatozoide y también inhiben a aquellos genes que de otro modo deberían dirigir a las células germinales a iniciar la ovogénesis.

La ovogénesis puede comenzar únicamente cuando es suprimida la actividad de *fem*. Esta supresión parece actuar a nivel de la traducción del RNA. La región 3' sin traducir (3' UTR) del mRNA de *fem-3* contiene una secuencia que une una proteína represora durante el desarrollo normal. Si esta región es mutada de modo tal que el represor no se pueda unir, el mRNA de *fem-3* se mantiene sin ser traducido y nunca se producirá la ovogénesis. El resultado es un cuerpo hermafrodita que produce únicamente espermatozoides (Ahringer y Kimble 1991; Ahringer y col. 1992). El represor que actúa en *trans* del mensajero de *fem-3* es una combinación de las proteínas Nanos y Pumilio (la misma combinación que reprime la traducción del mensajero *hunchback* en *Drosophila*). La regulación en más de la expresión de Pumilio puede ser crítica en la regulación del cambio de la línea germinal desde la espermatogénesis hacia la ovogénesis, debido a que Nanos es producido constitutivamente. Nanos parece ser necesario en *C. elegans* (como lo es en *Drosophila*) para la supervivencia de todas las células de la línea germinal (Kraemer y col. 1999).

* El gen *glp-1* parece estar involucrado en *C. elegans* en un número de interacciones inductivas. Usted no dudará en recordar que la proteína GLP-1 también es necesaria por la blastómera AB para que ésta reciba señales inductivas desde la blastómera EMS para formar los músculos faríngeos (véase cap. 8).

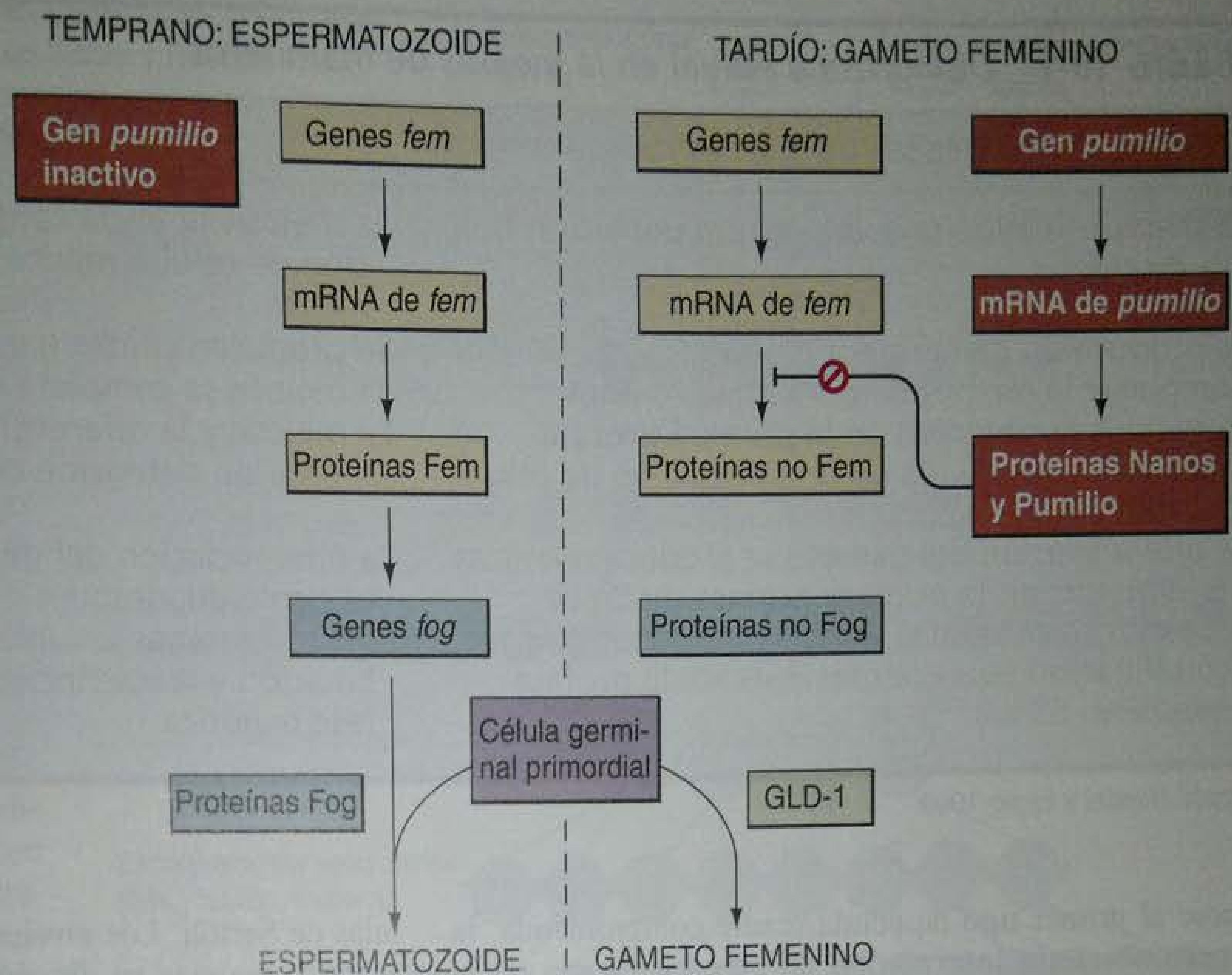


Fig. 19-18. Modelo de cambio de la determinación del sexo en la línea germinal de los hermafroditas de *C. elegans*. La determinación del sexo en tejidos somáticos muestra una jerarquía de regulación negativa. En la larva temprana, Pumilio no es sintetizado y el mRNA de *fem* es capaz de ser traducido. Las proteínas FEM activan a los genes *fog*, cuyas proteínas hacen que las células germinales experimenten espermatogénesis. Tardíamente en el desarrollo, *pumilio* es activado, y se combina con Nanos para producir un represor de la traducción de *fem*. Sin FEM, la proteína GLD-1 puede funcionar asegurando que la célula germinal experimente ovogénesis.

SITIO WEB 19.5 Determinación sexual de la línea germinal en *C. elegans* (Germ line sex determination in *C. elegans*. El establecimiento de si una célula germinal es convertida en un espermatozoide o en un gameto femenino involucra múltiples niveles de inhibición. La regulación traduccional se observa en varias de estas etapas.

Espermatogénesis

Formación de la espermátide haploide

Mientras que las divisiones reduccionales de la meiosis están conservadas en cada reino eucariótico de vida, la regulación de la meiosis en mamíferos difiere significativamente entre los machos y las hembras. Las diferencias entre la **ovogénesis**, la producción de gametos femeninos y la **espermatogénesis**, la producción de espermatozoides se explican en el cuadro 19-1.

La espermatogénesis es la producción de espermatozoides desde las células germinales primordiales. Una vez que las CGP llegan a la cresta genital de un embrión macho, quedan incorporadas a los cordones sexuales. Permanecen allí hasta la madurez, momento en el que los cordones sexuales se ahuecan para formar los túbulos seminíferos y el epitelio de los túbulos se diferencia a células de Sertoli. El comienzo de la espermatogénesis durante la pubertad probablemente está regulado por la síntesis de BMP8b por la célula germinal espermatogénica, la **espermatogonia**. Cuando BMP8b alcanza una concentración crítica, las células germinales comienzan a diferenciarse. Las células en diferenciación producen elevados niveles de BMP8b, que luego puede estimular más su diferenciación. Los ratones que carecen de BMP8b no inician la espermatogénesis en la pubertad (Zhao y col. 1996).

Las células germinales espermatogénicas son unidas por las células de Sertoli mediante moléculas de cadherina-N sobre ambas superficies celulares y por moléculas de galactosiltransferasa sobre las células espermatogénicas que se unen a un receptor de carbohidrato sobre las células de Sertoli (Newton y col. 1993; Pratt y col. 1993). Las células de Sertoli nutren y protegen a las células espermáticas en desarrollo y la espermatogénesis –la vía de desarrollo desde célula germinal a espermatozoide maduro– se produce en el receso entre las células de Sertoli (fig. 19-19). Los procesos por los cuales las CGP generan espermatozoides han sido estudiados en detalle en varios organismos, pero aquí se centrará sobre la espermatogénesis en mamíferos.

Después de alcanzar la gónada, las CGP se dividen para formar la **espermatogonia tipo A_1**. Estas células son más pequeñas que las CGP y están caracterizadas por un núcleo ovoide que contiene cromatina asociada con la membrana nuclear. Las espermatogonias tipo A_1 son halladas adyacentes a la membrana basal externa de los cordones sexuales. Ellas son células madre y en la madurez, se piensa que ellas se dividen para producir otra espermatogonia tipo A_1 así como un segundo tipo de célula más pálida, la espermatogonia tipo A_2. Por lo tanto, cada tipo de espermatogonia A_1 es una célula madre capaz de autorregenerarse así como de producir un nuevo tipo celular. La espermatogonia A_2 se divide para producir la espermatogonia A_3, que luego engendra la espermatogonia tipo A_4. Es posible que cada uno de los tipos de espermatogonia A sea una célula madre capaz de autorrenovarse.

La espermatogonia A_4 tiene tres opciones: puede formar otra espermatogonia A_4 (autorrenovarse); puede experimentar muerte celular (apoptosis); o puede diferen-

Cuadro 19-1 *Dismorfismo sexual en la meiosis de mamíferos*

Ovogénesis de la hembra	*Espermatogénesis del macho*
La meiosis se inicia una vez en una población finita de células	La meiosis se inicia continuamente en una población de células madre que se dividen mitóticamente
Se produce un gameto por meiosis	Se producen cuatro gametos por meiosis
Completar la meiosis demora meses o años	La meiosis se completa en días o semanas
La meiosis es detenida en la primera profase meiótica y reiniciada en una población de células más pequeña	La meiosis y la diferenciación avanzan continuamente sin detención del ciclo celular
La diferenciación del gameto se produce mientras es diploide, en la primera profase meiótica	La diferenciación del gameto se produce mientras es haploide, después de finalizada la meiosis
Todos los cromosomas exhiben transcripción y recombinacion equivalentes durante la profase meiótica	Los cromosomas sexuales son excluidos de recombinación y transcripción durante la primera profase meiótica

Fuente: Handel y Eppig 1998.

ciarse al primer tipo de célula madre comprometida, la **espermatogonia intermedia.** La espermatogonia intermedia está comprometida a convertirse en espermatozoide, y se divide mitóticamente una vez que forma la **espermatogonia tipo B**. Estas células son los precursores de los espermatocitos y son la última célula de la línea que experimenta mitosis. Ellas se dividen una vez más para generar los **espermatocitos primarios**– las células que entran en meiosis.

La transición entre espermatogonia y espermatocitos parece ser mediada por el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), que es secretado por las células de Sertoli. Los niveles de GDNF determinan si las espermatogonias en división se mantienen como espermatogonias o entran en la vía para llegar a ser espermatocitos. Bajos niveles de GDNF favorecen la diferenciación de la espermatogonia, mientras que los niveles elevados favorecen la autorrenovación de las células madre (Meng y col. 2000). Debido a que GDNF es regulado en más por la hormona foliculoestimulante (FSH), GDNF puede servir como un enlace entre las células de Sertoli y el sistema endocrino y proporciona un mecanismo para que la FSH instruya al testículo a producir más espermatozoides (Tadokoro y col. 2002).

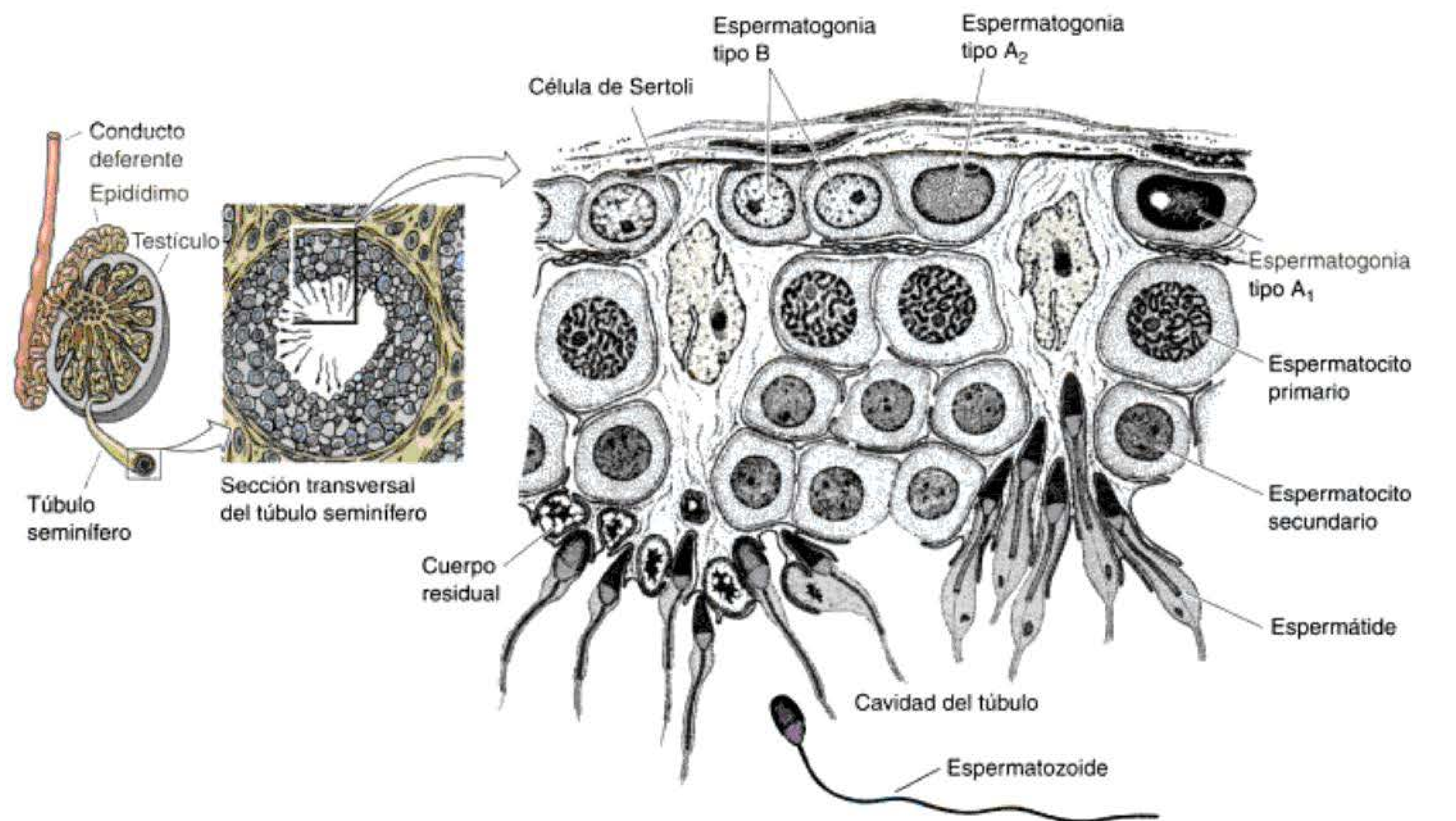


Fig. 19-19. Una sección de un túbulo seminífero, que muestra las relaciones entre las células de Sertoli y los espermatozoides en desarrollo. A medida que las células germinales maduran, avanzan hacia la cavidad del túbulo seminífero. (Según Dym 1977.)

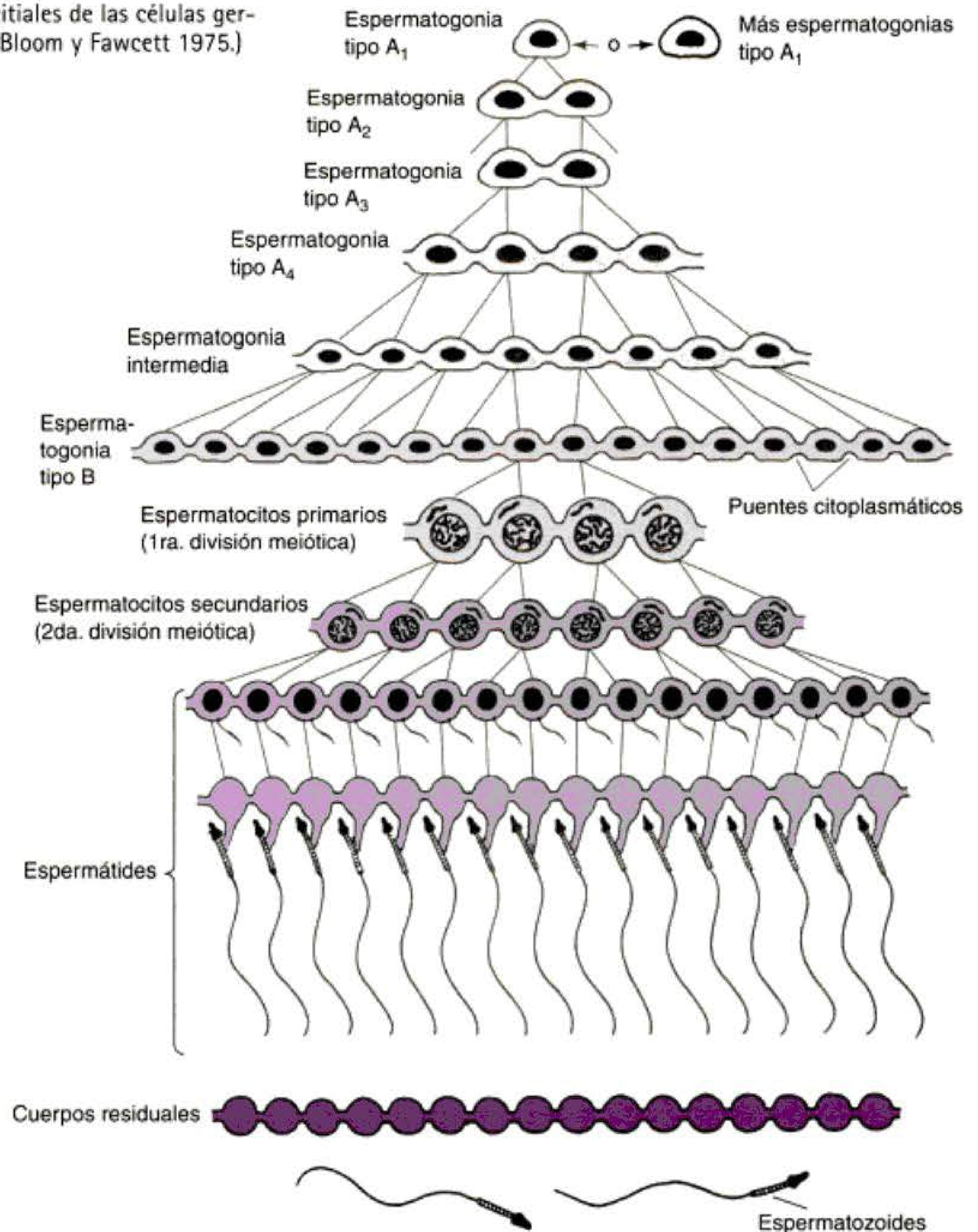


Fig. 19-20. Formación de clones sincitiales de las células germinales masculinas humanas. (Según Bloom y Fawcett 1975.)

Cuando se observa la figura 19-20, se puede hallar que durante las divisiones de las espermatogonias, la citocinesis no es completa. En su lugar, las células forman un sincitio por el cual cada una de las células se comunica con las otras mediante puentes citoplasmásticos de cerca de 1μm de diámetro (Dym y Fawcett 1971). Las divisiones sucesivas producen clones de células interconectadas y debido a que iones y moléculas pasan fácilmente a través de estos puentes citoplasmáticos, cada cohorte madura sincrónicamente. Durante este tiempo, el núcleo del espermatocito a menudo transcribe genes cuyos productos serán usados posteriormente para formar el axonema y el acrosoma.

Cada espermatocito primario experimenta la primera división meiótica para producir un par de **espermatocitos secundarios**, que completan la segunda división de la meiosis. Las células haploides formadas de este modo se denominan **espermátides** y todavía están conectadas entre sí a través de sus puentes citoplasmáticos. Las espermátides que están conectadas de este modo tienen núcleos haploides, pero son funcionalmente diploides, debido a que un producto génico producido en una célula realmente puede difundir hacia el citoplasma de sus vecinas (Braun y col. 1989).

Durante las divisiones desde la espermatogonia tipo A_1 a espermátide, las células se mueven más y más lejos de la membrana basal del túbulo seminífero y se acercan a su cavidad (véase fig. 19-19). Por lo tanto, cada tipo de célula puede ser encontrada en una capa particular del túbulo. Las espermátides están localizadas en el borde de la cavidad y aquí pierden sus conexiones citoplasmáticas y se diferencian a espermatozoides. En humanos, la progresión de célula madre de espermatogonia a espermatozoide maduro toma 65 días (Dym 1994).

SITIO WEB 19.6 **Sincitio entre las gonias: un puente al futuro (Gonial syncytia: Bridges to the future).** Los productos de las divisiones meióticas están conectados por puentes citoplasmáticos. Las funciones de estas conexiones pueden diferir entre aquellas células que producen espermatozoides y aquellas que producen gametos femeninos.

Espermiogénesis: la diferenciación de los espermatozoides

La espermátida haploide de mamífero es una célula redondeada, sin flagelo que no se parece en nada al espermatozoide maduro del vertebrado. La siguiente etapa en la maduración del espermatozoide, entonces, es la **espermiogénesis** (o **espermateliosis**), la diferenciación del espermatozoide. Para que se produzca la fecundación, el espermatozoide tiene que encontrarse y unirse con un gameto femenino y la espermiogénesis prepara al espermatozoide para estas funciones de motilidad e interacción. El proceso de diferenciación de espermatozoides fue mostrado en la figura 7-2. La primera etapa es la construcción de la vesícula acrosómica desde el aparato de Golgi. El acrosoma forma un casquete que cubre al núcleo del esperma-

tozoide. A medida que se forma el casquete acrosómico, el núcleo rota de modo tal que el casquete quedará después enfrentado a la membrana basal del túbulo seminífero. Esta rotación es necesaria debido a que el flagelo, que está comenzando a formarse desde el centríolo sobre el otro lado del núcleo, se extenderá hacia la cavidad. Durante el último estadio de la espermiogénesis, el núcleo se aplana y se condensa, el citoplasma restante se desecha (el cuerpo residual o "gota citoplasmática") y las mitocondrias forman un anillo alrededor de la base del flagelo.

Uno de los principales cambios en el núcleo es el reemplazo de las histonas por protaminas. La transcripción de los genes para protaminas es observada en las espermátides haploides tempranas, aunque la traducción es demorada por varios días (Peschon y col. 1987). Las protaminas son proteínas relativamente pequeñas con cerca de un 60% de arginina. Durante la espermiogénesis, los nucleosomas se disocian, y las histonas del núcleo haploide son finalmente reemplazadas por protaminas. Esto causa la paralización completa de la transcripción en el núcleo y facilita que éste adquiera una estructura casi cristalina. El espermatozoide resultante luego ingresa en la cavidad del túbulo.

En el ratón, el desarrollo desde célula madre a espermatozoide toma 34,5 días. El estadio de espermatogonia dura 8 días, el de la meiosis dura 13 días y la espermiogénesis toma otros 13,5 días. En los seres humanos, el desarrollo del espermatozoide toma casi el doble de tiempo. Debido a que las espermatogonias tipo A_1 son células madre, la espermatogénesis puede producirse continuamente. Cada día, se producen en cada testículo humano unos 100 millones de espermatozoides y cada eyaculación libera 200 millones de espermatozoides. Los espermatozoides que no se utilizan son reabsorbidos o pasan al exterior del cuerpo en la orina. Durante su tiempo de vida, un macho humano puede producir 10^{12} a 10^{13} espermatozoides (Reijo y col. 1995).

SITIO WEB 19.7 **Expresión génica durante la espermatogénesis (Gene expression during spermatogenesis).** La transcripción se produce a partir de los núcleos de espermatocitos diploides y a partir de los núcleos de espermátides haploides. El control postranscripcional también es importante en la regulación de la expresión génica del espermatozoide.

SITIO WEB 19.8 **El Nebenkern (The Nebenkern).** Las mitocondrias de los espermatozoides son frecuentemente muy modificadas para hacer a la célula más aerodinámica. Las mitocondrias de la mosca se fusionan para formar una estructura denominada el Nebenkern; esta fusión está controlada por el gen *fuzzy onions*.

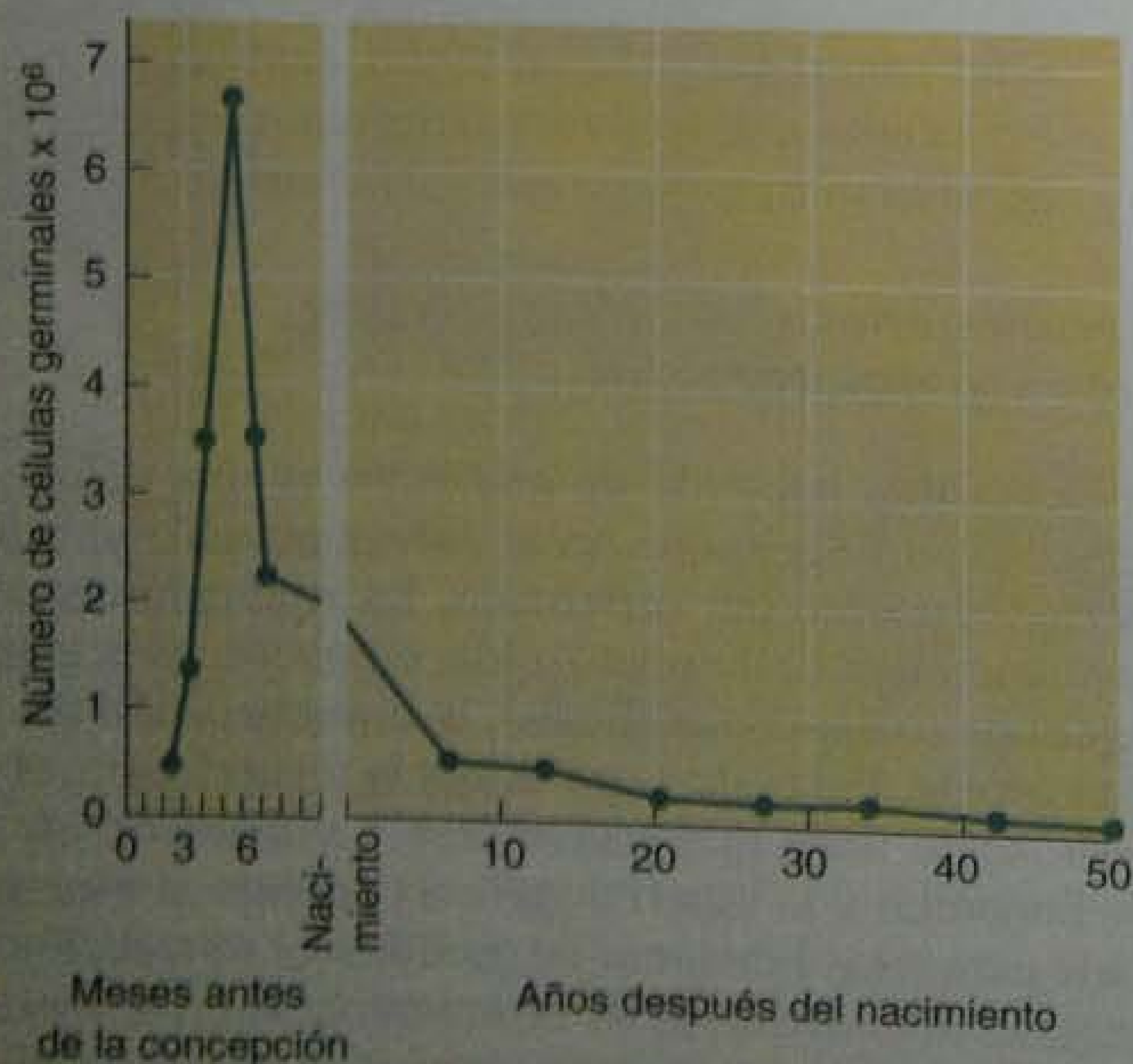


Fig. 19-21. Cambios en el número de células germinales en el ovario humano durante toda la vida. (Según Baker 1970.)

Ovogénesis

Meiosis ovogénica

La ovogénesis –la diferenciación del gameto femenino– difiere del espermatozoide en varios sentidos. Mientras que el gameto formado por la espermatogénesis es esencialmente un núcleo móvil, el gameto formado por la ovogénesis contiene todo el material necesario para iniciar y mantener el metabolismo y el desarrollo. Por esta razón, además de formar un núcleo haploide, la ovogénesis también construye una reserva de enzimas citoplasmáticas, mRNA, organelas y sustratos metabólicos. Mientras que el espermatozoide se diferencia para la motilidad, el gameto femenino desarrolla un citoplasma sorprendentemente complejo.

Los mecanismos de la ovogénesis varían entre las especies más que los de los espermatozoides. Esta variación no debería sorprender, debido a que los patrones de reproducción varían enormemente entre las especies. En algunas especies, tales como el erizo de mar y las ranas, la hembra produce rutinariamente cientos o miles de huevos (gametos femeninos) en un momento, mientras que en otras especies, como humanos y en la mayoría de los mamíferos, solo se producen unos pocos gametos femeninos durante el tiempo de vida de un individuo. En las especies que producen miles de gametos femeninos, las células germinales, denominadas **ovogonias**, son células madre que se autorrenuevan y que perduran por toda la vida del organismo. En las especies que producen pocos gametos femeninos, la ovogonia se divide para formar un limitado número de células precursoras de gametos femeninos. En el embrión humano, mil o más ovogonias se dividen rápidamente desde el segundo al séptimo mes de gestación para formar casi 7 millones de células germinales (fig. 19-21). Sin embargo, después del séptimo mes de desarrollo embrionario, el número de células germinales cae precipitadamente. La mayor parte de las ovogonias muere durante este período, mientras que las ovogonias restantes entran en la primera división meiótica (Pinkerton y col. 1961). Estas últimas células, denominadas **ovocitos primarios**, progresan a través de la primera profase meiótica hasta el estadio de diploteno, punto en el que serán mantenidas hasta que la hembra madure. Con el comienzo de la pubertad, grupos de ovocitos reinician periódicamente la meiosis. Por lo tanto, en la hembra humana, la primera parte de la meiosis comienza en

el embrión y la señal para reiniciar la meiosis no es dada hasta casi 12 años más tarde. En realidad, algunos ovocitos son mantenidos en la profase meiótica por casi 50 años. Como lo indica la figura 19-21, los ovocitos primarios continúan muriendo incluso después del nacimiento. De los millones de ovocitos primarios presentes al nacimiento, solo cerca de 400 maduran durante el tiempo de vida de una mujer.

La meiosis ovogénica también difiere de la meiosis espermatogénica en la colocación de la placa metafásica. Cuando el ovocito primario se divide, su núcleo, denominado la **vesícula germinal**, se destruye y el huso de la metafase migra hacia la periferia de la célula. En la telofase, una de las dos células hijas no contiene casi citoplasma, mientras que la otra célula retiene casi la totalidad del volumen de los constituyentes celulares (fig. 19-22). La célula más pequeña es denominada el **primer cuerpo polar**, y la célula más grande es referida como el **ovocito secundario**. Durante la segunda división meiótica, tiene lugar una citocinesis desigual similar. La mayoría del citoplasma es retenido por el gameto femenino maduro (óvulo), y un segundo cuerpo polar recibe un poco más que el núcleo haploide. Por lo tanto, la meiosis ovogénica conserva el volumen del citoplasma del ovocito en una célula en lugar de separarlo equitativamente entre las cuatro progenies.

En unas pocas especies de animales, la meiosis es profundamente modificada de modo tal que el gameto resultante es diploide y no necesita ser fecundado para desarrollarse. Se dice que tales animales son **partenogenéticos** (del griego, "nacimiento virgen"). En la mosca *Drosophila mangabeirai*, uno de los cuerpos polares actúa como un espermatozoide y "fecunda" al ovocito después de la segunda división meiótica. En otros insectos (tales como *Moraba virgo*) y en el lagarto *Cnemidophorus uniparens*, la ovogonia duplica su número cromosómico antes de la meiosis, de modo tal que la reducción de los cromosomas restaura el número diploide. Las células germinales del saltamontes *Pycnoscelus surinamensis* prescinden totalmente de la meiosis: forman un gameto femenino diploide mediante dos divisiones mitóticas (Swanson y col. 1981). Todas estas especies consisten enteramente en hembras. En otras especies, la partenogénesis haploide es ampliamente utilizada no solo como un medio de reproducción, sino también como un mecanismo de determinación sexual. En los Himenópteros (abejas, avispas y hormigas), los gametos femeninos sin fecundar se desarrollan en machos, mientras que los gametos fecundados, que son diploides, se desarrollan como hembras. Los machos haploides son capaces de producir espermatozoides al abandonar la primera división meiótica, formando de este modo dos espermatozoides mediante la segunda meiosis.

Maduración del ovocito en los anfibios

El gameto femenino es responsable de iniciar y dirigir el desarrollo, y en algunas especies (como se verá más adelante), la fecundación incluso no es necesaria. El material acumulado en el citoplasma del ovocito incluye fuentes de energía y organelas productoras de energía (el vitelo y la mitocondria); las enzimas y los precursores para la síntesis de DNA, de RNA y de proteínas; almacenamiento de RNA mensajeros; proteínas estructurales, y factores regulatorios morfogenéticos que controlan la embriogénesis temprana. Un catálogo parcial de los materiales almacenados en el citoplasma del ovocito se muestra en el cuadro 19-2, mientras que una lista parcial de mRNA almacenado se muestra el cuadro 5-2. La mayor parte de esta acumulación tiene lugar durante la profase I meiótica, que es a menudo subdividida en dos fases, **previtelo-**

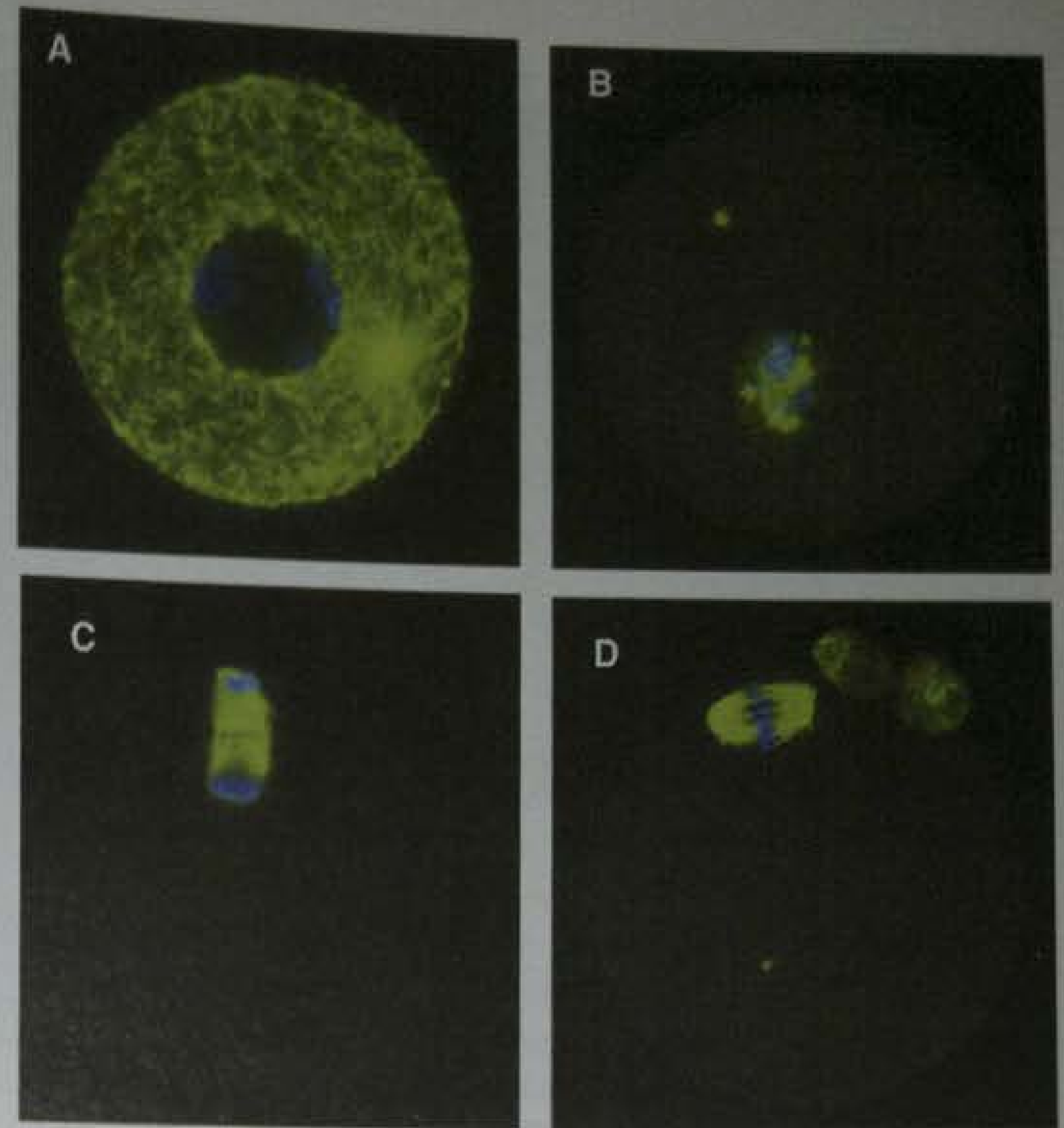


Fig. 19-22. Meiosis en el ovocito de ratón. La tubulina de los microtúbulos está teñida de verde; el DNA está teñido de azul. **A.** Ovocito de ratón en profase meiótica. El núcleo haploide de gran tamaño (la vesícula germinal) todavía está intacto. **B.** La envoltura nuclear de la vesícula germinal se rompe a medida que comienza la metafase. **C.** Anafase I de la meiosis, mediante la cual el huso mitótico migra hacia la periferia del ovocito I y libera un pequeño cuerpo polar. **D.** Metafase II de la meiosis por medio de la cual se suelta el segundo cuerpo polar (el primer cuerpo polar también se ha dividido). (De De Vos 2002; microfotografías cortesía de L. De Vos.)

Cuadro 19-2 *Componentes celulares almacenados en el ovocito de Xenopus laevis*

Componente	*Exceso aproximado por encima de la cantidad en las células larvarias*
Mitocondria	100.000
RNA polimerasas	60.000-100.000
DNA polimerasas	100.000
Ribosomas	200.000
tRNA	10.000
Histonas	15.000
Trifosfatos de desoxirribonucleótidos	2.500

Fuente: Según Laskey 1979.

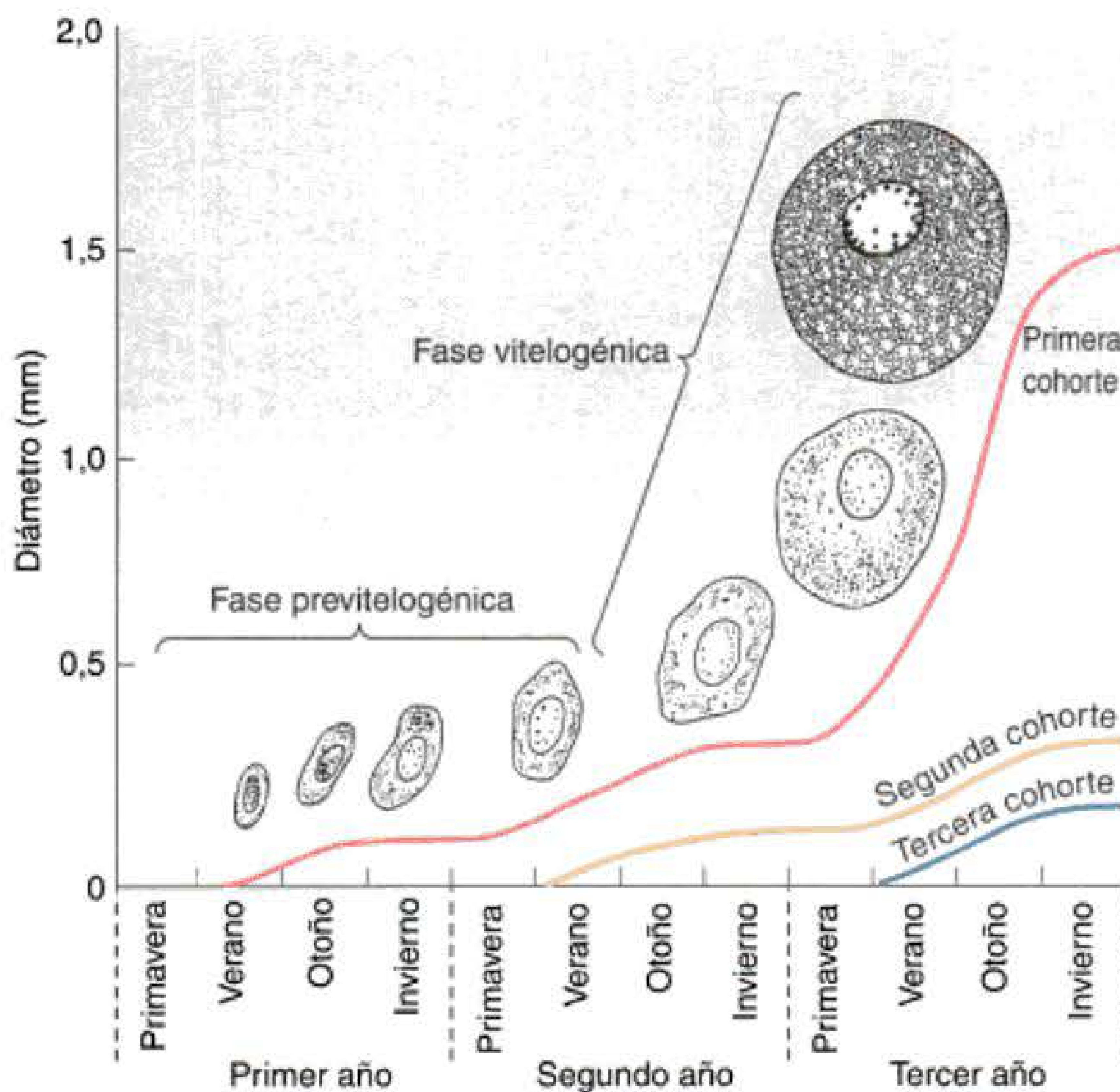


Fig. 19-23. Crecimiento de los ovocitos en la rana. Durante los 3 primeros años de vida, se producen tres cohortes de ovocitos. Los dibujos siguen el crecimiento de la primera generación de ovocitos. (Según Grant 1953.)

génesis (del griego, "antes de la formación de vitelo") y **vitelogénesis**.

Los gametos femeninos de peces y anfibios son derivados de una población de célula madre de ovogonia que puede generar una nueva cohorte de ovocitos cada año. En la rana *Rana pipiens*, la ovogénesis toma 3 años. Durante los dos primeros años, el ovocito incrementa su tamaño muy progresivamente. Sin embargo, durante el tercer año la rápida acumulación de vitelo en el ovocito causa que el huevo se hinche hacia su gran tamaño característico (fig. 19-23). Los gametos femeninos maduran en lotes anuales, madurando la primera cohorte después de la metamorfosis; el grupo siguiente madura un año más tarde.

La vitelogénesis se produce cuando el ovocito alcanza el estadio de diploteno de la profase meiótica. El vitelo no es una única subunidad, sino una mezcla de materiales utilizados para la nutrición embrionaria. El principal componente del vitelo en los gametos femeninos de rana es una proteína de 470 kDa denominada **vitelogenina**. Ésta no es producida en el ovocito de la rana (como sucede con las principales proteínas vitelínicas de organismos tales como anélidos y los cangrejos de río), pero es sintetizada en el hígado y transportada por el torrente sanguíneo al ovario (Flickinger y Rounds 1956; Danilchik y Gerhart 1987).

A medida que el vitelo está siendo depositado, las organelas también se organizan asimétricamente. Los gránulos corticales comienzan a formarse desde el aparato de Golgi; al comienzo se encuentran esparcidos al azar por todo el citoplasma del ovocito, pero posteriormente migran hacia la periferia de la célula. La mitocondria se replica en este momento, dividiéndose para formar una "nube mitocondrial." Estos millones de mitocondrias serán distribuidas hacia las diferentes blastómeras durante la segmentación. (En *Xenopus*, no serán formadas nuevas mitocondrias hasta después de iniciada la gastrulación.) A medida que la vitelogénesis se acerca al final, el citoplasma del ovocito se vuelve estratificado. Los gránulos corticales, las mitocondrias y los gránulos de pigmento están localizados en la periferia del ovocito, dentro de la corteza rica en actina. Dentro del citoplasma interno, surgen distintos gradientes. Mientras que las plaquetas de vitelo se encuentran más densamente concentradas en el polo vegetal del ovocito, los gránulos de glucógeno, los ribosomas, las vesículas lipídicas y el retículo endoplásmático son hallados hacia el polo animal. Incluso mRNA específicos almacenados en el citoplasma se encuentran localizados en ciertas regiones del ovocito.

SITIO WEB 19.9 **Control hormonal de la producción de vitelo. (Hormonal control of yolk production).** La vitelogénesis en anfibios está mediada primariamente por estrógeno. El estrógeno instruye al hígado a expresar y secretar vietelogenina, y esta proteína es absorbida de la sangre por el joven ovocito.

SITIO WEB 19.10 **Transporte del mRNA Vg1 (Transporting the Vg1 mRNA).** La proteína Vera se une específicamente al 3' UTR del mensajero de *Vg1*. Vera puede unir mRNA de *Vg1* a un grupo de vesículas del retículo endoplasmático que son translocadas hacia la corteza vegetal.

SITIO WEB 19.11 **Establecimiento de la polaridad del gameto femenino (Establishment of egg polarity).** En varias especies, el ovocito en desarrollo es una célula flagelada cuyo flagelo marca el futuro polo animal del gameto femenino. Este flagelo se pierde durante la ovogénesis.

Finalización de la meiosis en los anfibios: progesterona y fecundación

Los ovocitos primarios de anfibios pueden permanecer en el estadio de diploteno de la profase meiótica por años. Este estado se asemeja a la fase G_2 del ciclo de división celular de la mitosis (véase capítulo 8). La reanudación de la meiosis en el ovocito de anfibio requiere de progesterona. Esta hormona es secretada por las células del folículo en respuesta a las hormonas gonadotróficas

secretadas por la glándula hipófisis. Dentro de las 6 horas de la estimulación de la progesterona se produce la **ruptura de la vesícula germinal** (del inglés, GVBD; *germinal vesicle breakdown*), la retracción de las microvellosidades, los nucléolos se desintegran y los cromosomas se contraen y migran hacia el polo animal para comenzar la división. Poco después, se produce la primera división meiótica y el gameto femenino maduro es liberado del ovario por un proceso denominado **ovulación**. El gameto ovulado cuando es liberado se encuentra en la segunda metafase meiótica (fig. 19-24).

¿Cómo hace la progesterona para permitirle al gameto femenino romper su latencia y reiniciar la meiosis? Para entender los mecanismos por los que es llevada a cabo la activación, es necesario revisar brevemente el modelo para la división temprana de la blastómera (véase cap. 8). El ingreso a la fase mitótica (M) del ciclo celular (en la meiosis y en la mitosis) está regulado por el **factor promotor de la mitosis** o **FPM** (originalmente denominado "factor promotor de la maduración" después de su función meiótica). El FPM contiene dos subunidades, la **ciclina B** y la proteína **p34**. La proteína p34 es una cinasa dependiente de ciclina; su actividad es dependiente de la presencia de ciclina. Debido a que todos los componentes del FPM están presentes en el ovocito de anfibios, generalmente se piensa que la progesterona de algún modo convierte a un complejo pre-FPM en un FPM activo.

El mediador de la señal de progesterona es la proteína **c-mos**. La progesterona reinicia la meiosis haciendo que el gameto femenino poliadenile el mRNA de *c-mos* materno que ha sido almacenado en el citoplasma (Sagata y col. 1988; Sheets y col. 1995; Mendez y col. 2000). Este mensajero es traducido a una fosfoproteína de 39 kDa. Esta proteína c-mos es detectable únicamente durante la maduración del ovocito y es destruida rápidamente en la fecundación. Aún durante su tiempo de vida breve, juega un papel fundamental en la liberación del gameto de su estado de latencia. La proteína c-mos activa una cascada de fosforilación que fosforila y activa a la subunidad p34 del FPM (Ferrell y Machleder 1998; Ferrell 1999). El FPM activo permite la ruptura de la vesícula germinal y que se dividan los cromosomas. Si se inhibe la traducción de *c-mos* mediante la inyección de mRNA antisentido de *c-mos* en el ovocito, no se produce la ruptura de la vesícula germinal ni el reinicio de la maduración del ovocito.

Sin embargo, la maduración del ovocito luego encuentra un segundo bloqueo. El FPM puede llevar a los cromosomas solo a través de la primera división meiótica y de la profase de la segunda división meiótica. El ovocito se detiene nuevamente en la metafase de la segunda división meiótica. Este bloqueo de la metafase es causado por las acciones combinadas de c-mos y de otra proteína, la cinasa 2 dependiente de ciclina (cdk2; Gabrielli y col. 1993). Estas dos proteínas son subunidades que conjuntamente forman el **factor citostático (CSF)**, que es hallado en los huevos de rana maduros (gametos femeninos maduros) y que puede bloquear el ciclo celular en metafase (Matsui 1974). Se piensa que el CSF impide la degradación de la ciclina.

El bloqueo de la metafase es roto por la fecundación. La evidencia sugiere que el flujo de iones de calcio que asiste a la fecundación permite que la proteína **calmodulina** que une calcio se vuelva activa. La calmodulina, a su vez, puede activar a dos enzimas que inactivan al CSF: la proteína cinasa II dependiente de calmodulina, que inactiva a la cinasa cdk2 y calpaína II, una proteasa dependiente de calcio que degrada a c-mos (Watanabe y col. 1989; Lorca y col. 1993). Esta acción promueve la divi-

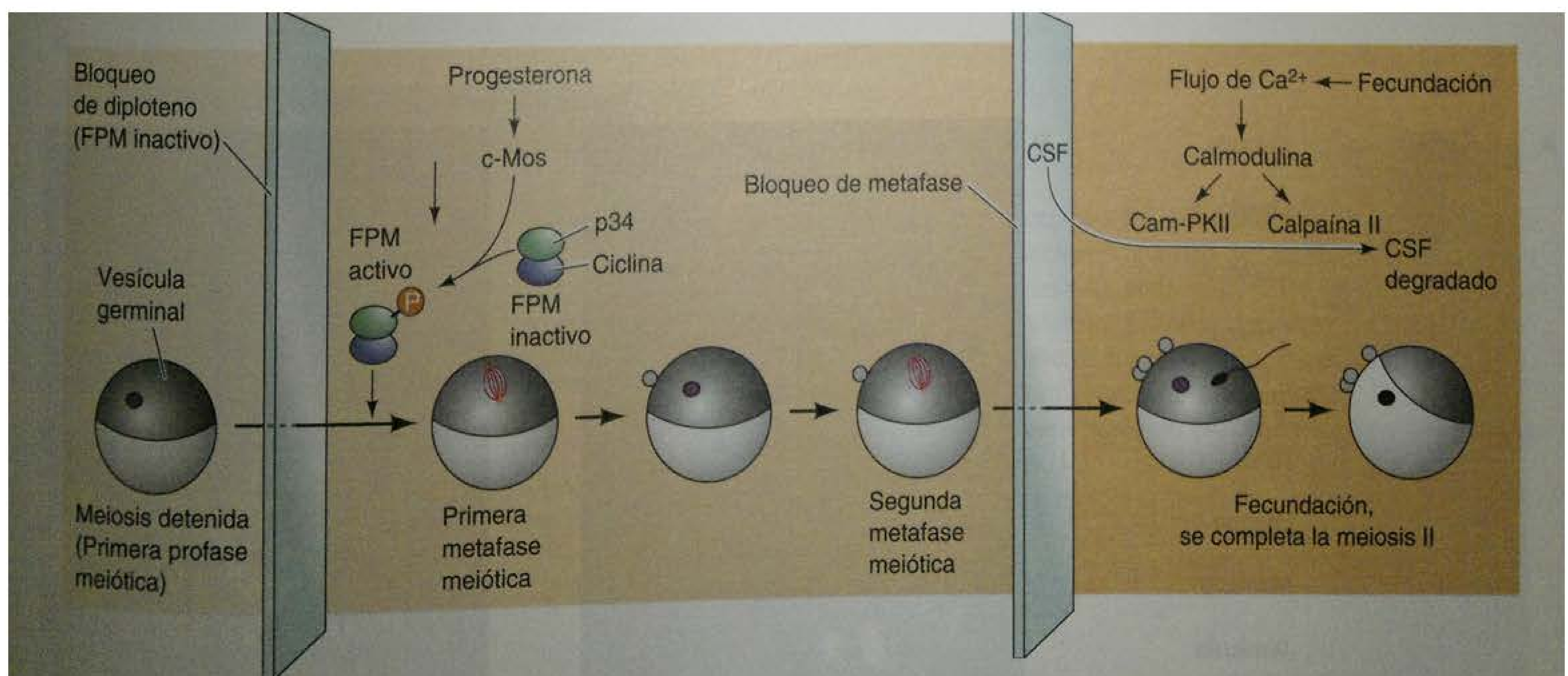


Fig. 19-24. Representación esquemática de la maduración del ovocito de *Xenopus*, que muestra la regulación de la división celular meiótica mediante progesterona y fecundación. La maduración del ovocito es detenida en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica mediante la carencia de FPM. La progesterona activa la producción de la proteína c-mos. Esta proteína inicia una cascada de fosforilación que finalmente fosforila la subunidad p34 del FPM, permitiendo que el FPM se vuelva activo. El FPM conduce el ciclo celular durante la primera división meiótica, pero la división posterior es bloqueada por el CSF, un componente que contiene c-mos y cdk2. En la fecundación, los iones calcio liberados hacia el citoplasma son unidos por la calmodulina y son utilizados para activar dos enzimas, la proteína cinasa II calmodulina dependiente y la calpaína II, que inactivan y degradan al CSF. Se completa la meiosis II y los dos pronúcleos haploides pueden fusionarse. En este momento, la ciclina B es resintetizada, permitiendo el comienzo del primer ciclo de segmetación.

sión celular de dos modos. En primer lugar, sin CSF, la ciclina puede ser degradada y se completa la división meiótica. En segundo lugar, la proteína cinasa II dependiente de calcio también permite la duplicación del centrosoma, formando de este modo los polos del huso meiótico (Matsumoto y Maller 2002). La coordinación de la fecundación y de la meiosis parece estar íntimamente coordinada a través de la liberación y unión de iones de calcio.

Transcripción de genes en los ovocitos

En la mayoría de los animales (los insectos son su principal excepción), el ovocito en crecimiento es activo en transcribir genes cuyos productos son necesarios para el metabolismo celular, para procesos específicos del ovocito o para el desarrollo temprano antes de que los núcleos derivados del cigoto comiencen a funcionar. En ratones, por ejemplo, el ovocito en diploteno que está en crecimiento está transcribiendo activamente genes para las proteínas de zona pelúcida ZP1, ZP2 y ZP3. Además, estos genes son transcritos únicamente en el ovocito y no en cualquier otro tipo celular (fig. 19-25; Roller y col. 1989; Lira y col. 1990; Epifano y col. 1995).

El ovocito de anfibio tiene ciertos períodos de síntesis de RNA muy activa. Durante el estadio de diploteno, ciertos cromosomas estiran grandes lazos de DNA, haciendo que el cromosoma se asemeje a una escobilla (un instrumento práctico para limpiar tubos de ensayo en los días antes de las microfugas). Estos *cromosomas en escobilla* (fig. 19-26A) pueden ser revelados por hibridación in situ como sitios de síntesis de RNA. Los cromosomas de los ovocitos pueden incubarse con una sonda de RNA radiactivo y utilizando autorradiografía se pueden visualizar las localizaciones precisas donde los genes están siendo transcritos. La figura 19-26B muestra al cromosoma I en diploteno del tritón *Triturus cristatus* después de la incubación con mRNA radiactivo de histona. Resulta obvio que un gen de histona (o una serie de genes de histona) está siendo transcrito sobre una de las asas del cromosoma en escobilla. Las microfotografías electrónicas de los transcritos génicos desde cromosomas en escobilla también permiten ver cadenas de mRNA desprendiéndose de cada gen a medida que éste es transcrito (véase Hill y MacGregor 1980).

Además de la síntesis de mRNA, durante la ovogénesis también son transcritos RNA ribosómico y RNA de transferencia. La figura 19-27A muestra el patrón de síntesis de rRNA y tRNA durante la ovogénesis del *Xenopus*. La transcripción parece comenzar en los ovocitos tempranos (estadio I, 25-40 μm), durante el estadio de diploteno de la meiosis. En este momento, se producen todos los rRNA y tRNA necesarios para la síntesis de proteínas hasta el estadio de blástula media y todos los mRNA maternos necesarios para el desarrollo temprano. Este estadio dura meses en *Xenopus*. La velocidad de producción de RNA ribosómico es prodigiosa. El genoma del ovocito de *Xenopus* tiene cerca de 1800 genes codificando rRNA 18S y 28S (los dos RNA que forman los ribosomas), y estos genes son amplificados selectivamente de modo tal que hay cerca de 500.000 genes produciendo RNA ribosómico en el ovocito (fig. 19-27B; Brown y David 1968). Cuando el ovocito madura (estadio IV) alcanza un cierto tamaño, sus cromosomas se condensan y los genes de rRNA no se transcriben más. Esta condición de "ovocito maduro" también puede durar meses. En el momento de la estimulación hormonal, el ovocito completa su primera división meiótica y es ovulado. Los mRNA almacenados por el ovocito ahora se unen con los ribosomas para iniciar la síntesis de proteínas. Dentro de horas, la segunda división meiótica ha comenzado, y el ovocito secundario ha sido fecundado. Los genes del embrión no comienzan a activar

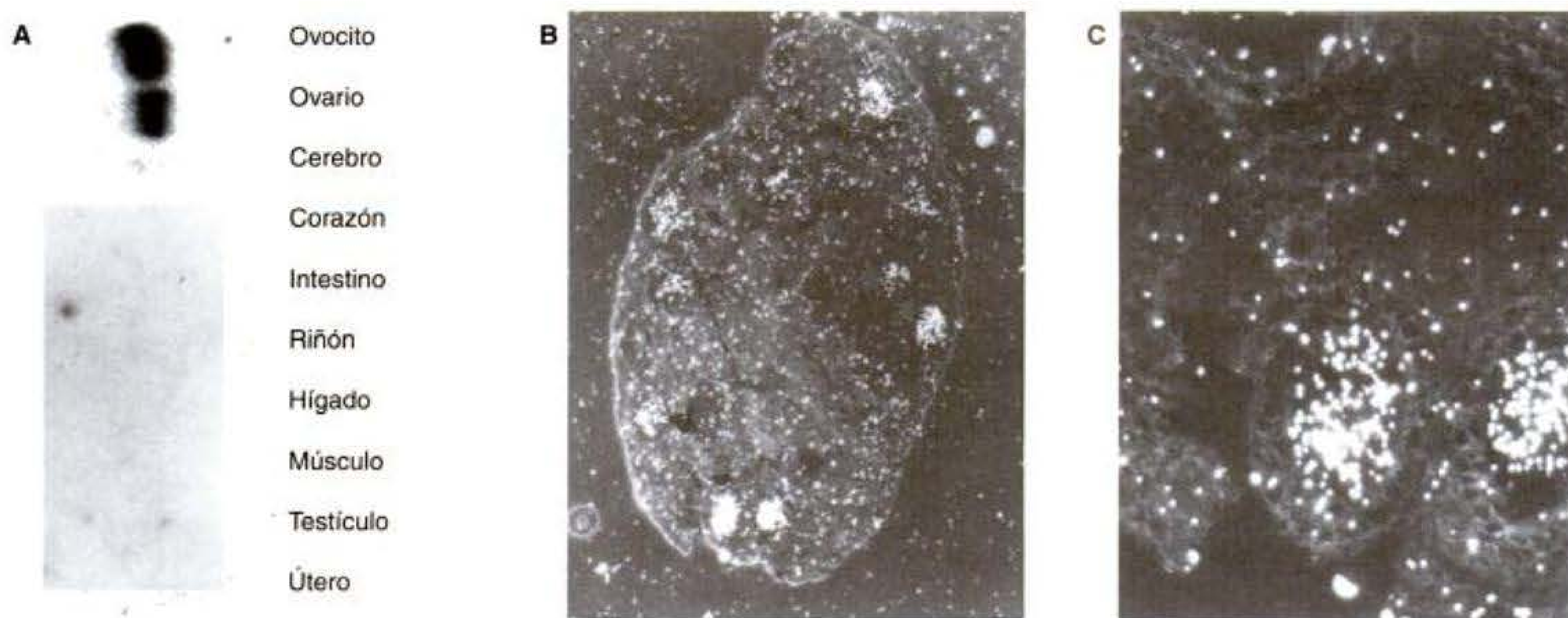


Fig. 19-25. Expresión del gen *ZP3* en el ovocito de ratón en desarrollo. **A.** Northern blot de la acumulación del mRNA de *ZP3* en los tejidos de un embrión de ratón de 13 días. Una sonda radiactiva para el mensajero de *ZP3* lo localiza expresado solamente en el ovario y específicamente en los ovocitos. **B.** Cuando el gen reportero de la luciferasa es colocado sobre el promotor de *ZP3* e insertado en el genoma del ratón, el mensajero de la luciferasa se observa solamente en los ovocitos del ovario en desarrollo. **C.** Mayores aumentos de una sección de B, que muestran dos folículos ováricos con ovocitos en maduración. (A, de Roller y col. 1989; B y C, de Lira y col. 1990; microfotografías cortesía de P. Wassarman.)

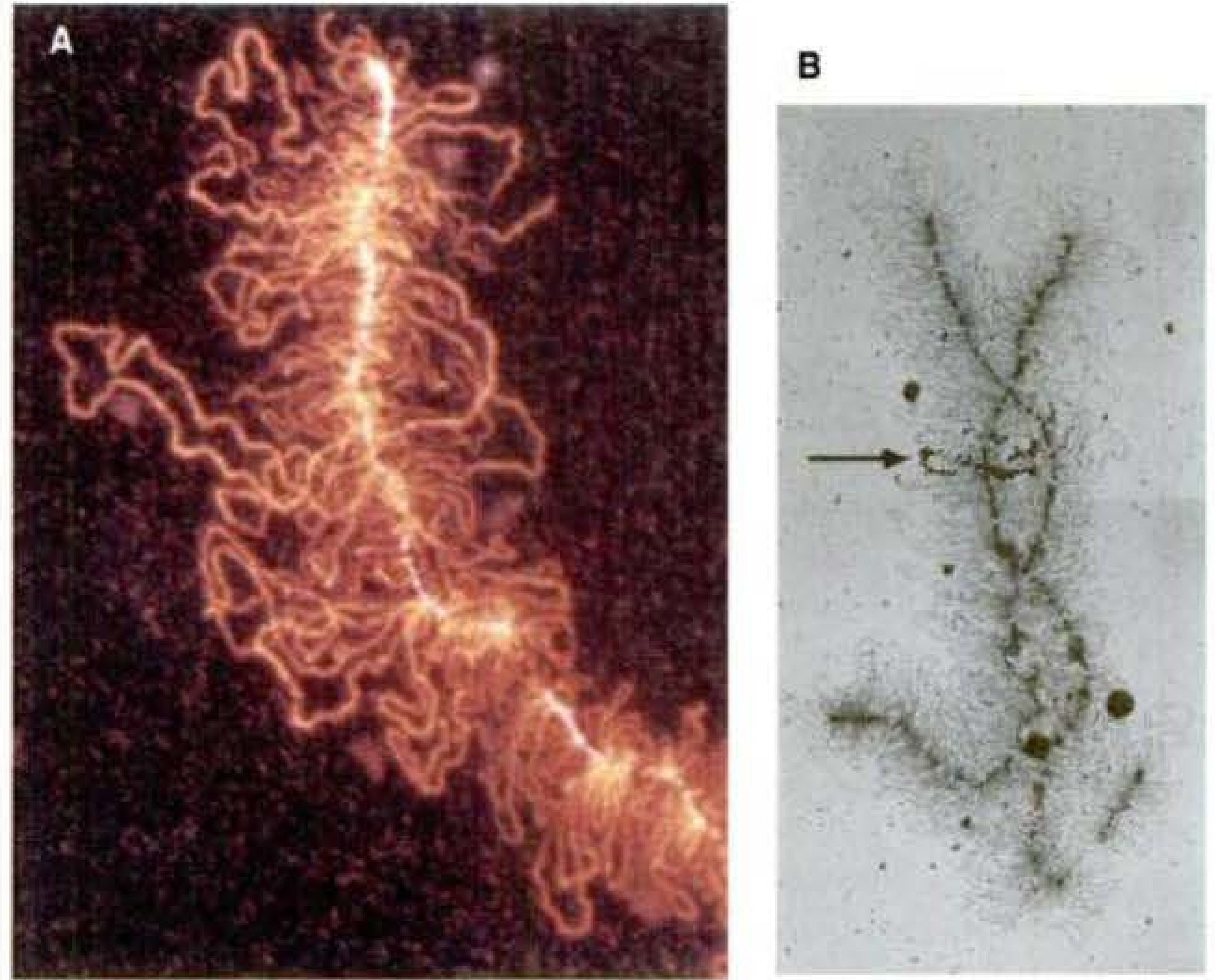
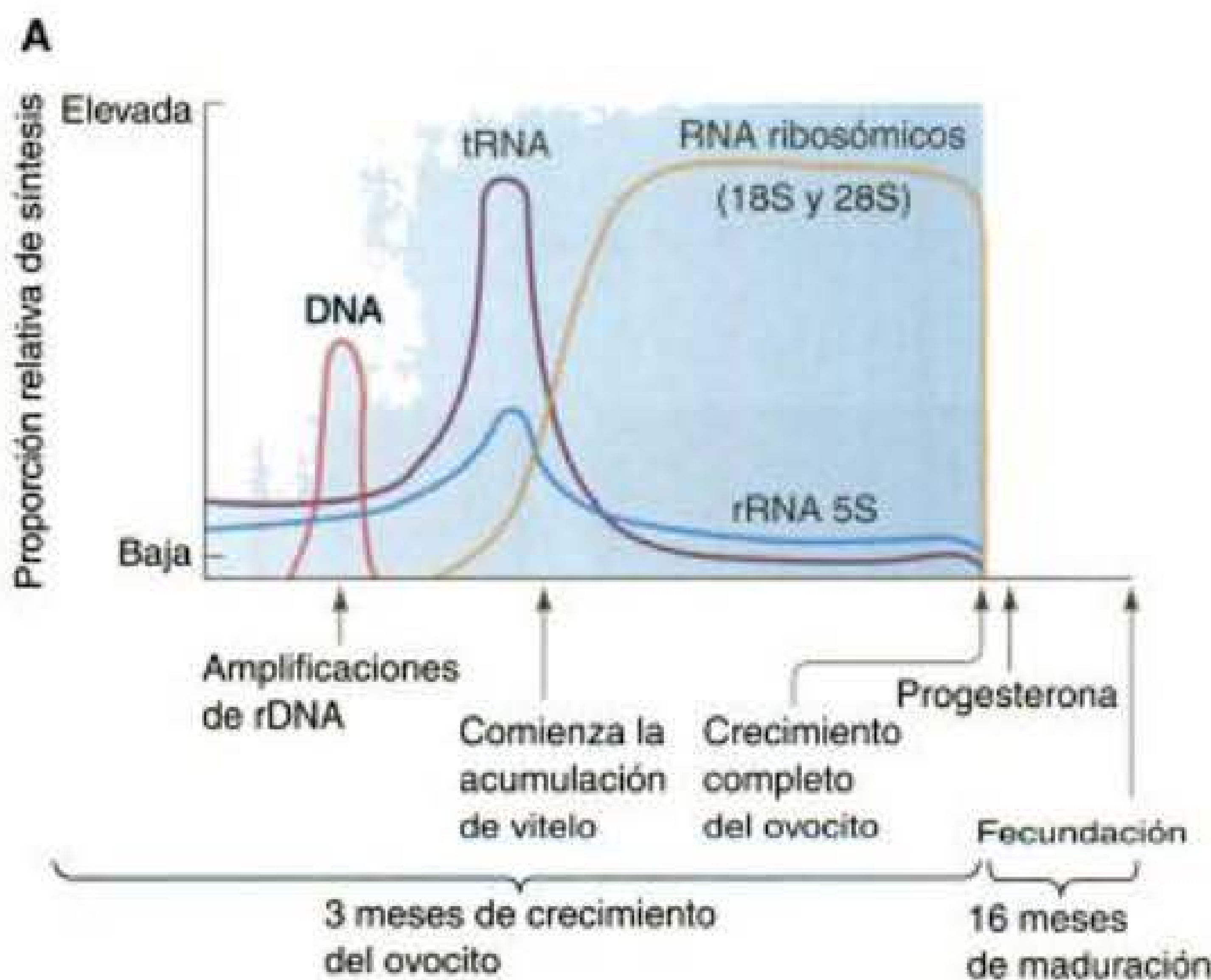


Fig. 19-26. En los ovocitos de anfibios, los cromosomas en escobilla son activos en la vesícula germinal en diploteno durante la primera profase meiótica. **A.** Cromosoma en escobilla de la salamandra *Notophthalmus viridescens*. Las asas de DNA (blanco) se extienden hacia afuera y son transcritas a RNA (rojo). **B.** Localización (flecha) de la transcripción del gen de histona de un cromosoma en escobilla de un tritón *Triturus cristatus*. Los genes han sido visualizados por hibridación in situ y autorradiografía. (**A**, cortesía de M. B. Roth y J. Gall; **B**, de Old y col. 1977, cortesía de H. G. Callan.)

la transcripción hasta la transición blástula media (Newport y Kirschner 1982).

Como se vio en el capítulo 5, los ovocitos de varias especies producen dos clases de mRNA –aquellos para el uso inmediato en el ovocito y los que son almacenados para utilizar durante el desarrollo temprano–. En los erizos de mar, la traducción de mensajeros almacendos en el ovocito (mRNA maternos) es iniciada en la fecundación, mientras que en ranas, la señal para tal traducción es iniciada por la progesterona cuando el gameto está próximo a ser ovulado. Uno de los resultados de la actividad del FPM inducido por progesterona puede ser la fosforilación de proteínas sobre el 3' UTR de mRNA almacenados en el ovocito. La fosforilación de estos factores está asociada con el alargamiento de las colas de poli(A) de los mensajeros almacenados y su posterior traducción (Paris y col. 1991).

SITIO WEB 19.12 **Ovocito que sintetiza ribosomas (Synthesizing oocyte ribosomes).** Los ribosomas son casi un "producto diferenciado" del ovocito, y el ovocito de *Xenopus* contiene tanto como 20.000 veces más de ribosomas que las células somáticas. La repetición y amplificación de genes son utilizadas para transcribir estas enormes cantidades de rRNA.



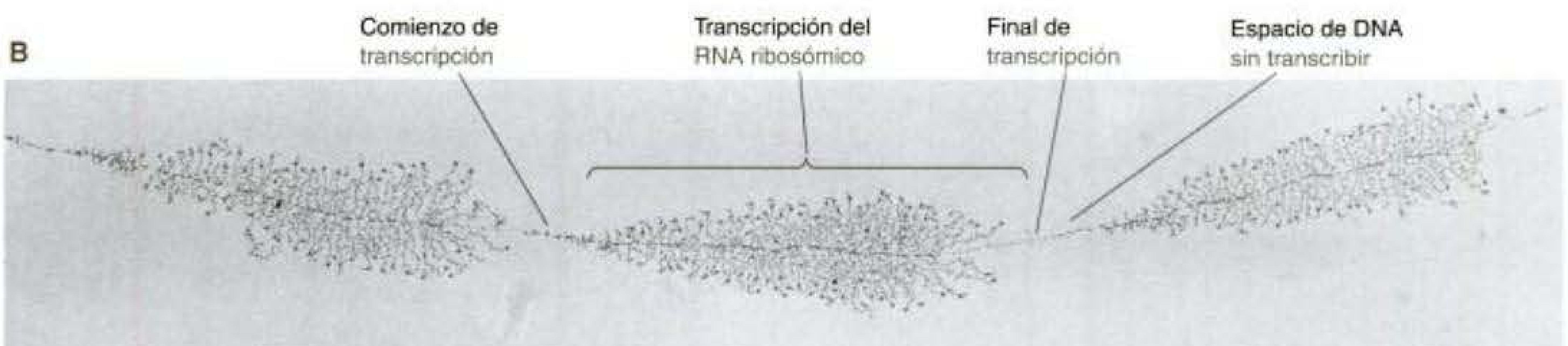
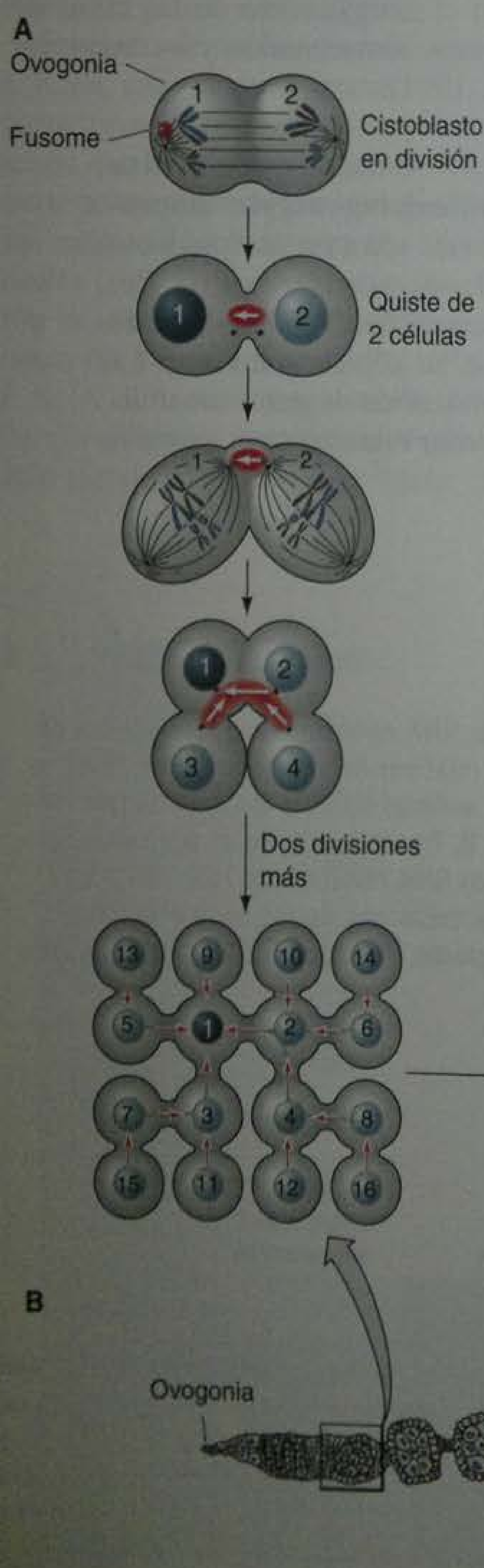


Fig. 19-27. Producción de RNA ribosómico en los ovocitos de *Xenopus*. **A.** Proporciones relativas de síntesis de DNA, tRNA y rRNA en la ovogénesis de anfibios durante los últimos tres meses antes de la ovulación. **B.** Transcripción de un precursor de RNA de gran tamaño de los RNA ribosómicos 28S, 18S y 5,8S. Estas unidades están conectadas una detrás de la otra, con unas 450 por genoma haploide. (**A**, según Gurdon 1976; **B**, cortesía de O. L. Miller, Jr.)

Ovogénesis meroística en insectos

Hay varios tipos de ovogénesis en insectos, pero la más estudiada está centrada sobre aquellos insectos, como *Drosophila* y polillas, que experimentan **ovogénesis meroística**, en la que se mantienen las conexiones citoplasmáticas entre las células producidas por la ovogonia. En *Drosophila*, cada ovogonia se divide cuatro veces para producir un clon de 16 células conectadas entre sí por **canales anulares**. La producción de estas células interconectadas, denominadas **cistoquistes**, implica una disposición altamente ordenada de divisiones celulares (fig. 19-28). Solo aquellas dos células que tienen cuatro interconexiones son capaces de desarrollarse hacia ovocitos y de aquellas dos, solo una llega a ser el huevo (gameto maduro). La otra comienza la meiosis pero no la completa. Por lo tanto, solo uno de los 16 cistoquistes puede convertirse en un gameto maduro. Todas las otras células se convierten en **células nodrizas**. A medida que esto sucede, la célula destinada a convertirse en el ovocito es aquella célula que se encuentra en el extremo más posterior de la cámara del huevo, u **ovariola**, que incluye al clon de 16 células. Sin embargo, debido a que las células nodrizas están conectadas con el ovocito por puentes citoplasmáticos, el complejo entero puede verse como una unidad de producción del huevo (gameto maduro).

Los ovocitos de insectos meroísticos no pasan a través de un estadio transcripcionalmente activo, ni tampoco tienen cromosomas en escobilla. En su lugar, la síntesis de RNA está en gran parte limitada a las células nodrizas, y el RNA producido por aquellas células es transportado activamente hacia el citoplasma del ovocito (véase fig. 9-13A). La ovogénesis tiene lugar en solo 12 días, por lo que las células nodrizas son metabólicamente muy activas durante ese tiempo. Ellas son ayudadas en su eficiencia transcripcional al hacerse politénicas. En lugar de tener dos copias de cada cromosoma, replican sus cromosomas hasta que han producido 512 copias. Las 15 células nodrizas pasan RNA ribosómico y mensajero, y también pueden ser transportados proteínas hacia el citoplasma del ovocito y ribosomas enteros. Los mRNA no se asocian a polisomas, lo que sugiere que no son inmediatamente activos en la síntesis de proteína (Paglia y col. 1976; Telfer y col. 1981).



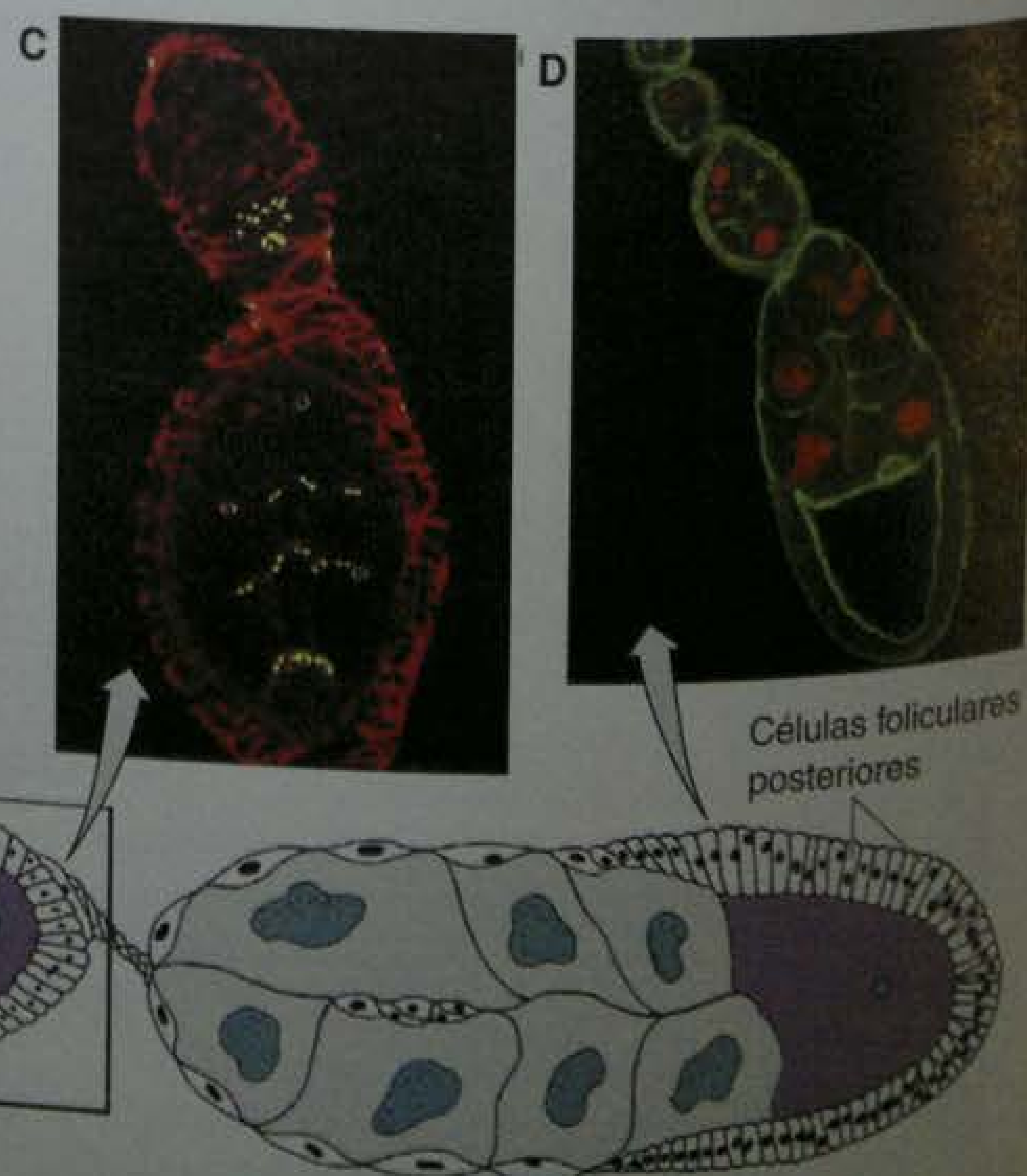


Fig. 19-28. La formación de 16 cistoquistes en *Drosphila*. **A.** Esquema de un ovario adulto, que muestra la secuencia de ovogénesis a medida que el quiste germinal más joven (germaria) madura. **B.** División de las células madre que forman el cistoquiste (cistoblastos). Las células están representadas esquemáticamente como dividiéndose en un solo plano. El cistoblasto se divide para producir otra célula madre más un ovogonio que está comprometido a formar los cistoquistes. Cuando un ovogonio se divide, el centríolo de la hija cistoquiste 1 retiene al fusoma (rojo), que crece a través del canal anular hacia su hermana mitótica. La flecha muestra la polaridad, señalando a la célula desde que la fusoma crece. Después de tres ciclos más de divisiones mitóticas, se forma el clon de 16 células. Si el transporte intracelular es coordinado por fusoma, el transporte de mRNA y proteínas debería ser hacia el cistoquiste 1, que debería por lo tanto convertirse en ovocito. **C.** Secciones a través del quiste germinal que muestran canales anulares (teñidos de amarillo). Aquí la actina está teñida de rojo. **D.** Secciones a través del centro de tres quistes germinales, que muestran la maduración del ovocito. La actina está teñida de verde, y el DNA nuclear está teñido de rojo. (**A**, según Ruohola y col. 1991; **B**, según Lin y Spradling 1995; **C**, fotografía cortesía de S. E. Roulier y S. Beckendorf; **D**, microfotografía cortesía de B. M. Mechler.)

El ovario meroístico nos enfrenta con algunos problemas interesantes. Si todos los cistoquistes están conectados de modo tal que las proteínas y RNA se intercambian libremente entre ellas, ¿por qué han de tener diferentes destinos de desarrollo? ¿Por qué un célula ha de convertirse en ovocito mientras que otras se convierten en "fábricas de síntesis de RNA," enviando mRNA, ribosomas y aún centríolos hacia el ovocito? ¿Por qué el flujo de proteína y RNA es solamente en una dirección?

A medida que se dividen los cistoquistes, una gran estructura rica en espectrina denominada el **fusoma** se forma y atraviesa los canales anulares entre las células (fig. 19-28D). Es construida asimétricamente, creciendo siempre desde el huso polar que la mantiene en una de las células después de la primera división (Lin y Spradling 1995; de Cuevas y Spradling 1998). La célula que retiene la mayor parte del fusoma durante la primera división se convierte en ovocito. Todavía no se sabe si el fusoma contiene determinantes ovogénicos o si éste dirige el tráfico de los materiales hacia esta célula particular.

Una vez que se establecen los patrones de transporte, el citoesqueleto se involucra activamente en el transporte de mRNA desde las células nodrizas hacia el citoplasma del ovocito (Cooley y Theurkauf 1994). Una disposición de microtúbulos que se extiende a través de canales anulares es crítica para la determinación del ovocito. En las células nodrizas, la proteína Exuperantia une al mensajero *bicoid* a los microtúbulos y lo transporta a la región anterior del ovocito (Cha y col. 2001; véase capítulo 8). Si se altera la disposición microtubular (químicamente o mediante mutaciones tales como *bicaudal-D* o *egalitarian*), los productos génicos de las células nodrizas son transmitidos en todas direcciones y las 16 células se diferencian a células nodrizas (Gutzeit 1986; Theurkauf y col. 1992, 1993; Spradling 1993). Las proteínas Bicaudal-D y Egalitarian probablemente son componentes centrales del sistema motor de la dineína que transportan mRNA y proteínas a través del ovocito (Bullock y Ish-Horowicz 2001). Es posible que algunos componentes transportados desde las células nodrizas hacia el ovocito se asocien con proteínas de transporte, tales como dineína y cinesina, que deberían permitirles viajar a lo largo de tractos de microtúbulos que se extienden a través de los canales anulares (Theurkauf y col. 1992; Sun y Wyman 1993). El mensajero *oskar*, por ejemplo, está asociado a la cinesina mediante la proteína Barentsz y la cinesina puede transportar al mensajero *oskar* hacia la región posterior del ovocito (van Eeden y col. 2001).

La actina puede ser importante para el mantenimiento de la polaridad del transporte durante los estadios tardíos de la ovogénesis. Las mutaciones que evitan el revestimiento de los canales anulares por los filamentos de actina, impiden el transporte de mRNA desde las células nodrizas hacia el ovocito y la alteración de los filamentos de actina genera una distribución al azar del mRNA (Cooley y col. 1992; Watson y col. 1993). Por lo tanto, el citoesqueleto controla el movimiento de organelas y RNA entre las células nodrizas y el ovocito de modo tal que las señales de desarrollo se intercambian solo en las direcciones apropiadas.

SITIO WEB 19.13 **Espermatogénesis de *Drosophila* (*Drosophila* spermatogenesis).** Los espermatozoides de *Drosophila* son derivados de células madre que mantienen una capacidad de división de largo plazo. La renovación de las células madre es especificada por la vía STAT, que responde a una señal específica de la célula de sostén.

Maduración del ovocito de mamífero

La ovulación en los mamíferos sigue uno de dos patrones, según la especie. Un tipo de ovulación es estimulada por el acto de la copulación. La estimulación física del cuello uterino desencadena la liberación de gonadotrofinas desde la hipófisis. Estas gonadotrofinas llevan al gameto femenino a reiniciar la meiosis y a iniciar los acontecimientos que lo expulsarán del ovario. Este mecanismo asegura que la mayor parte de las copulaciones resulten en gametos femeninos fecundados y los animales que utilizan este método de ovulación –como conejos y visones– tienen una reputación de éxito procreativo.

Sin embargo, la mayoría de los mamíferos tiene un patrón de ovulación periódica, en el que la hembra ovula solamente en momentos específicos del año. Este período ovulatorio se denomina **estro** (o su equivalente en inglés, "celo"). En estos animales, las señales ambientales, más notablemente la cantidad y tipo de luz durante el día, estimulan al hipotálamo a liberar hormona liberadora de gonadotrofina. Este factor estimula a la hipófisis a liberar las gonadotrofinas –hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)– que causan la proliferación y secreción de estrógeno por parte de las células del folículo ovárico. El estrógeno ingresa en ciertas neuronas y provoca el patrón de conducta de apareamiento característico de la especie. Las gonadotrofinas también estimulan el crecimiento folicular e inician la ovulación. Por lo tanto, la conducta de apareamiento y la ovulación se producen juntas.

Los seres humanos tienen una variación sobre el tema de la ovulación periódica. Aunque la mujer tiene ovulación cíclica (de un promedio aproximado de una vez cada 29,5 días) y definitivamente no tiene un estro anual, la mayor parte de la fisiología reproductiva humana es compartida con otros primates. La periodicidad característica de los primates en la maduración y en la liberación de gametos femeninos se denomina **ciclo menstrual** debido a que éste supone el desprendimiento periódico de sangre y tejido endotelial desde el útero a intervalos mensuales.* El ciclo menstrual representa la integración de tres ciclos muy diferentes:

* El desprendimiento periódico del revestimiento uterino es un tema polémico. Algunos científicos especulan que la menstruación es un proceso activo, con un significado adaptativo en la evolución. Profet (1993) propuso que la menstruación es una adaptación inmunológica clave, que protege al útero contra las infecciones contraídas desde el semen u otros agentes ambientales. Strassmann (1996) sugirió que la ciclicidad del endometrio es una adaptación que ahorra energía, que es importante en tiempos de pobre nutrición. El sangrado vaginal debería ser un aspecto de este proceso adaptativo. Finn (1998) afirmó que la menstruación no tiene un valor adaptativo y que es necesaria para las crisis inmunológicas que son una consecuencia de llevar juntos en el útero dos organismos genéticamente diferentes. Martin (1992) señaló que podría incluso ser erróneo pensar que hay una única función de la menstruación y que sus papeles podrían cambiar durante el ciclo de vida de la mujer.

1. El ciclo ovárico, cuya función es liberar y madurar un ovocito.
2. El ciclo uterino, cuya función es proporcionar el ambiente apropiado para el desarrollo del blastocisto.
3. El ciclo cervical, cuya función es permitir al espermatozoide ingresar al tracto reproductivo femenino solamente en el momento apropiado.

Estas tres funciones están integradas mediante las hormonas de la hipófisis, el hipotálamo y el ovario.

> VADE MECUM[2] **Ovogénesis en mamíferos (Oogenesis in mammals).** El desarrollo del gameto femenino en mamíferos y su sorprendente crecimiento durante el estadio de ovocito primario son el tema de las fotografías y películas de tiempo rápido de secciones histológicas a través de un ovario de mamífero.
> **[Hacer clic sobre Gametogenesis]**

La mayoría de los ovocitos dentro del ovario humano adulto es mantenida en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica (a menudo referida como **estado dictiado**). Cada ovocito está rodeado por un folículo primordial constituido por una capa simple de células granulosas epiteliales y una capa menos organizada de células tecales mesenquimáticas* (fig. 19-29). Periódicamente, un grupo de folículos primordiales ingresa en un estadio de crecimiento folicular. Durante este tiempo, el ovocito experimenta un aumento de volumen de unas 500 veces (que corresponde a un aumento en el diámetro del ovocito desde 10 μm en el folículo primordial hasta 80 μm en un folículo completamente desarrollado). Junto con el crecimiento del ovocito hay un aumento en el número de células de la granulosa, que forman capas concéntricas alrededor del ovocito. Esta proliferación de células de la granulosa está mediada por un factor paracrino, GDF9, un miembro de la familia TGF-β (Dong y col. 1996). A través de este período de crecimiento, el ovocito se mantiene en el estado dictiado. El folículo completamente crecido contiene un gran ovocito rodeado por varias capas de células de la granulosa. La más interna de estas células permanecerá con el gameto ovulado, formando el **cúmulo**, que rodea al gameto femenino (ovocito II) en el oviducto. Además, durante el crecimiento del folículo, se forma un **antro** (cavidad), que queda relleno de una mezcla compleja de proteínas, hormonas y otras moléculas. A medida que el ovocito en maduración sintetiza factores paracrinos que permiten la proliferación de las células foliculares, las células foliculares secretan factores de crecimiento y diferenciación (TGF-β2, VEGF, leptina, FGF2) que le permiten al ovocito crecer y traer vasos sanguíneos hacia la región folicular (Antczak y col. 1997).

En un momento determinado un pequeño grupo de folículos estará madurando. Sin embargo, después de progresar hacia un cierto estadio, la mayor parte de los ovocitos y sus folículos mueren. Para sobrevivir, el folículo debe ser expuesto a una onda de liberación de hormonas gonadotróficas, "agarrar la onda" en el tiempo correcto y recorrerla hasta que alcance su máximo. Por lo tanto, para que se produzca la maduración del ovocito, el folículo necesita estar en un cierto estadio de desarrollo cuando aparecen las ondas de gonadotrofinas.

* Nota del traductor: para algunos autores el concepto de folículo se refiere a la estructura caracterizada por el ovocito y las células foliculares que lo rodean (ambas estructuras forman parte del folículo). Por ejemplo, el folículo primordial está formado por el ovocito y una capa de células foliculares planas.

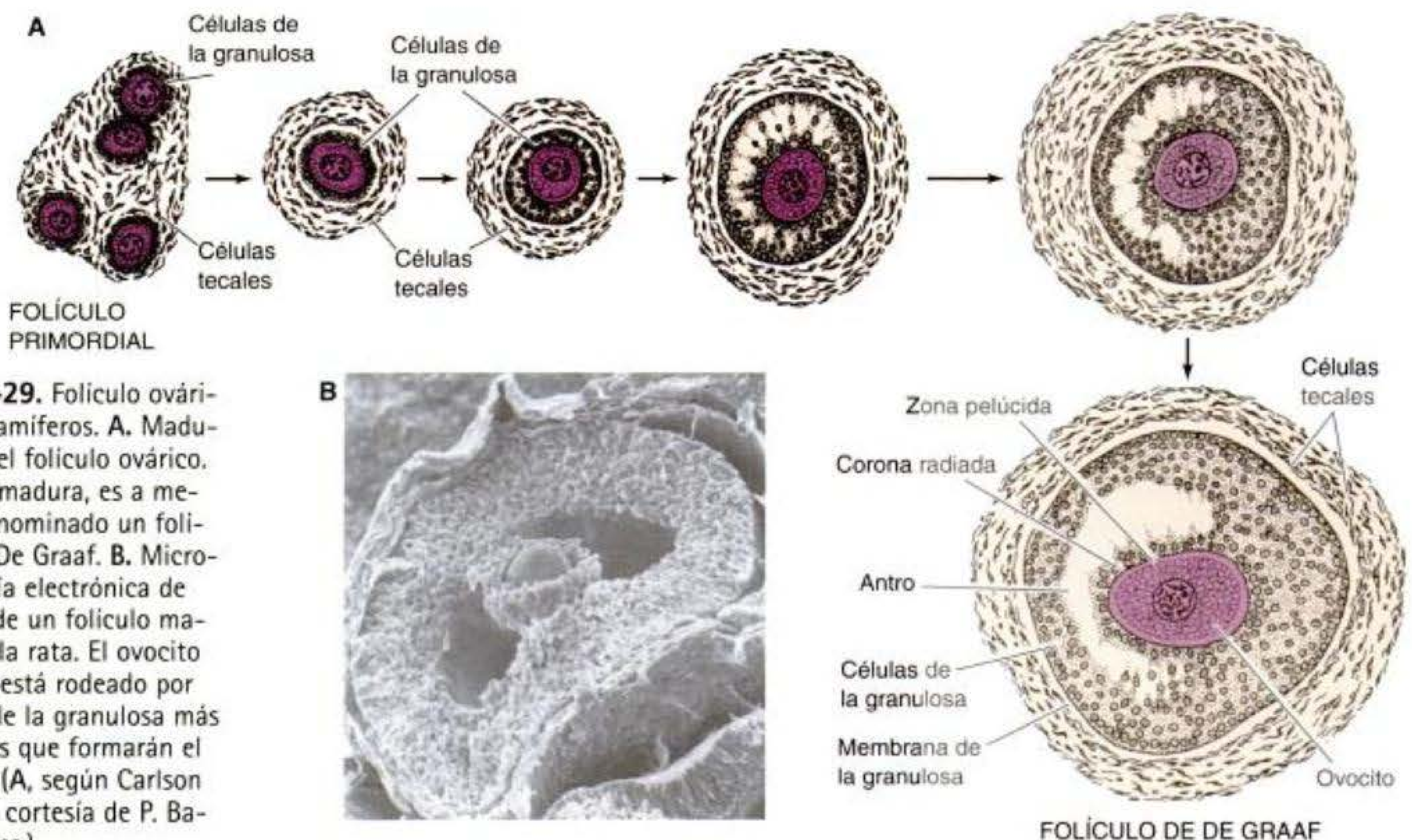


Fig. 19-29. Folículo ovárico de mamíferos. **A.** Maduración del folículo ovárico. Cuando madura, es a menudo denominado un folículo de De Graaf. **B.** Microfotografía electrónica de barrido de un folículo maduro en la rata. El ovocito (centro) está rodeado por células de la granulosa más pequeñas que formarán el cúmulo. (**A**, según Carlson 1981; **B**, cortesía de P. Bagavandoss.)

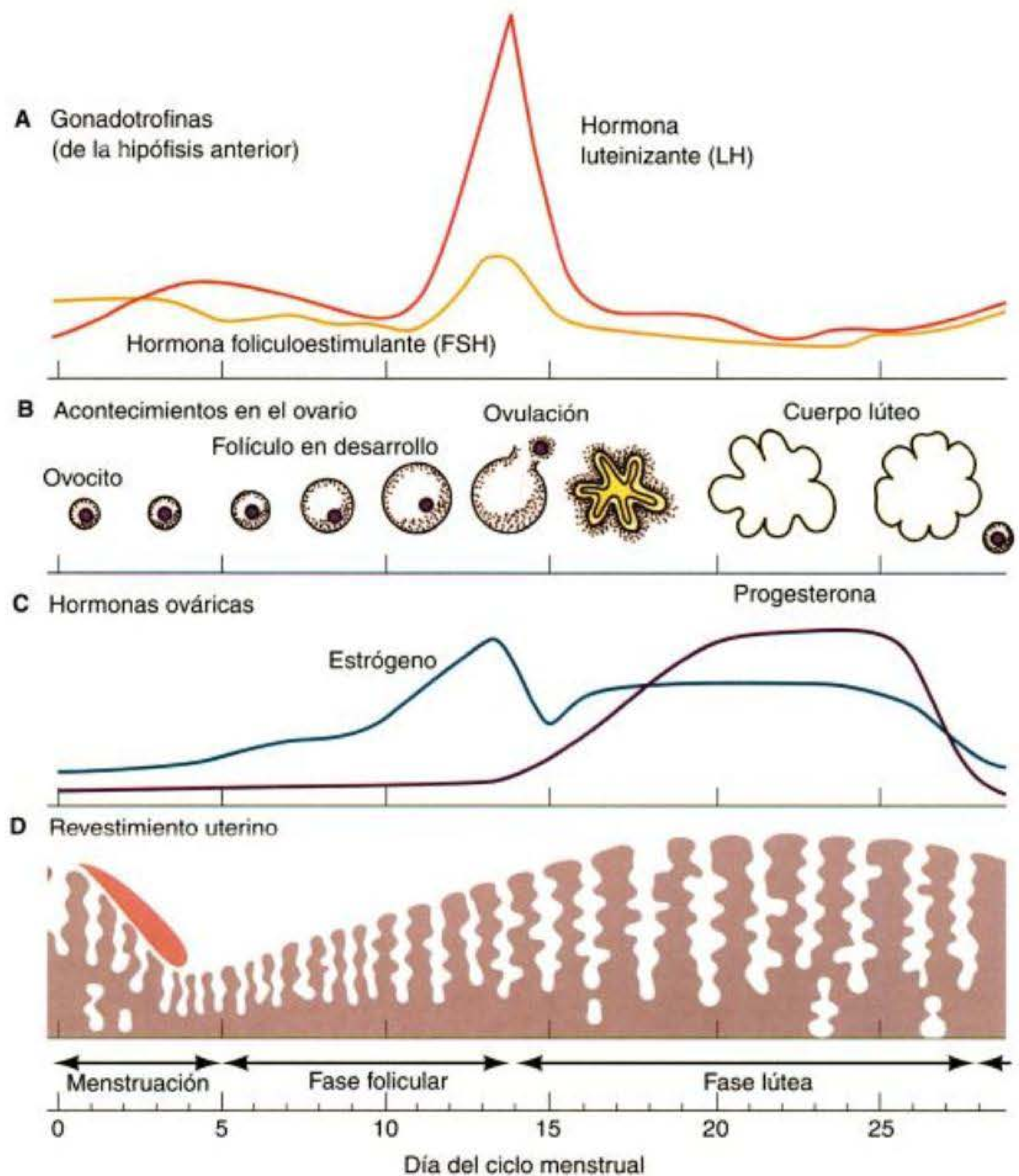


Fig. 19-30. El ciclo menstrual humano. La coordinación de los ciclos del **B**, ovario y **D**, uterino está controlada por **A**, la hipófisis y **C**, las hormonas ováricas. Durante la fase folicular, los gametos femeninos maduran dentro del folículo y el revestimiento uterino es preparado para recibir al blastocisto. El gameto femenino maduro (ovocito II) es liberado alrededor del día 14. Si no se implanta un blastocisto en el útero, la pared uterina comienza a desprenderse y lleva a la menstruación.

Se considera que el día 1 del ciclo menstrual es el primer día de sangrado vaginal (fig. 19-30). Este sangrado representa el desprendimiento de tejido endometrial y de los vasos sanguíneos que deberían haber ayudado a la implantación del blastocisto. En la primera parte del ciclo (denominada la **fase proliferativa** o **folicular**), la hipófisis comienza a secretar cantidades cada vez mayores de FSH. Los folículos en maduración que han alcanzado un cierto estadio de desarrollo responden a esta hormona con un mayor crecimiento y proliferación celular. La FSH también induce la formación de receptores de LH sobre las células de la granulosa. Poco tiempo después de este período de crecimiento folicular inicial, la hipófisis comienza a secretar LH. En respuesta a la LH, se rompe el bloqueo meiótico dictiado. Las membranas nucleares de los ovocitos competentes se destruyen y los cromosomas se reúnen para experimentar la primera división meiótica. Un grupo de cromosomas se mantiene dentro del ovocito y el otro termina en un pequeño cuerpo polar. Ambos están encerrados por la zona pelúcida, que ha sido sintetizada por el ovocito en crecimiento. Es en este estadio que el ovocito II será ovulado.

Las dos gonadotrofinas, actuando conjuntamente, llevan a que las células del folículo produzcan cantidades crecientes de estrógenos, que tiene al menos cinco actividades principales en la regulación de la progresión posterior del ciclo menstrual:

1. Hace que el endometrio uterino comience a proliferar y que se enriquezca con vasos sanguíneos.
2. Genera el adelgazamiento del moco cervical, permitiendo de este modo que el espermatozoide ingrese en las porciones internas del tracto reproductivo.
3. Lleva a un incremento en el número de receptores de FSH sobre las células de la granulosa de los folículos maduros mientras que causa en la hipófisis una disminución en su producción de FSH. También estimula a las células de la granulosa a secretar la hormona peptídica inhibina, que también suprime la secreción de FSH hipofisaria.
4. A bajas concentraciones, inhibe la producción de LH, pero en altas concentraciones la estimula.
5. A muy altas concentraciones y en períodos largos, el estrógeno interactúa con el hipotálamo, haciendo que éste secrete la hormona liberadora de gonadotropina.

A medida que aumentan los niveles de estrógeno como resultado de la producción folicular, disminuyen los niveles de FSH. Sin embargo, los niveles de LH, continúan aumentando a medida que se secreta más estrógeno. A medi-

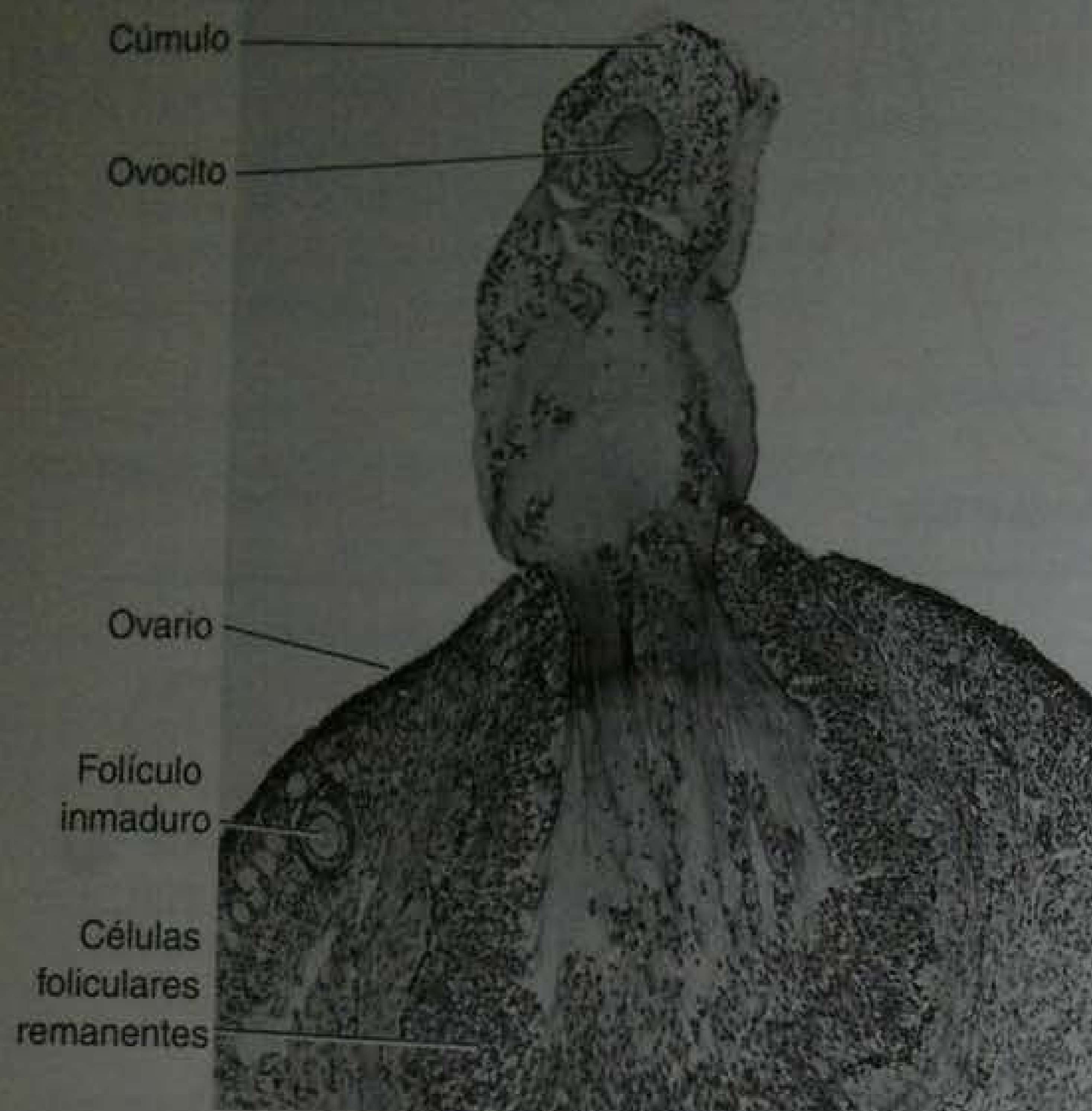


Fig. 19-31. Ovulación en el conejo. El ovario de un ratón vivo anestesiado fue expuesto y observado. Cuando el folículo comenzó a ovular, el ovario fue extirpado, fijado y teñido. (Microfotografía cortesía de R. J. Blandau.)

da que continúa la producción de más estrógeno (días 7-10), las células de la granulosa continúan creciendo.

Comenzando en el día 10, la secreción de estrógenos aumenta abruptamente. Esta elevación a mitad del ciclo es seguida por un enorme pico de LH (oleada o aumento brusco de LH) y una explosión menor de FSH. Los experimentos con monos hembra han demostrado que la exposición del hipotálamo a más de 200 pg de estrógeno por milímetro de sangre por más de 50 horas resulta en la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotrofina. Este factor lleva a la posterior liberación de FSH y LH desde la hipófisis. Dentro de 10-12 horas después del pico de gonadotrofinas, el ovocito II es ovulado (fig. 19-31; García y col. 1981).

Aunque el mecanismo detallado de la ovulación todavía no se conoce, la expulsión física del ovocito maduro desde el folículo parece ser el resultado de un aumento dentro del folículo de colagenasa, activador del plasminógeno y prostaglandinas, inducidos por la LH (Lemaire y col. 1973). Las prostaglandinas pueden causar contracciones localizadas en el músculo liso del ovario y también pueden incrementar el flujo de agua desde los capilares del ovario, lo que aumenta la presión del fluido en el antro (Diaz-Infante y col. 1974; Koos y Clark 1982). Si se inhibe la síntesis de prostaglandinas ováricas, no tiene lugar la ovulación. Además, las proteasas colagenasa y activador del plasminógeno liberan y digieren la matriz extracelular del folículo (Beers y col. 1975; Downs y Longo 1983). El mRNA para activador de plasminógeno ha estado latente en el citoplasma del ovocito. La LH hace que este mensajero sea poliadenilado y traducido a esta poderosa proteasa (Huarte y col. 1987). El resultado de la LH, por lo tanto, es el aumento de la presión folicular acoplado con la degradación de la pared folicular. Se digiere un orificio a través del cual el ovocito II puede salir.

Luego de la ovulación, comienza la **fase lútea** del ciclo menstrual. Las células remanentes del folículo roto, bajo la influencia continua de la LH, se convierten en el **cuerpo lúteo**. (Ellas son capaces de responder a esta LH debido a que el pico de FSH las estimula para que desarrollen aún más receptores de LH.) El cuerpo lúteo secreta algunos estrógenos, pero su secreción predominante es **progesterona**. Esta hormona esteroidea circula hacia el útero, donde completa el trabajo de preparación del tejido uterino para la implantación del blastocisto, estimulando el crecimiento de la pared uterina y de sus vasos sanguíneos. El bloqueo del receptor de progesterona con el esteroide sintético *mifepristone* (RU486) detiene el engrosamiento de la pared uterina y evita la implantación de un blastocisto* (Couzinet y col. 1986; Greb y col. 1999).

La progesterona también inhibe la producción de FSH, e impide de este modo la maduración de más folículos y ovocitos. (Por esta razón, una combinación de estrógeno y progesterona ha sido utilizada en las píldoras de control de la natalidad. El crecimiento y la maduración de un nuevo ovocito son impedidos mientras esté inhibida la síntesis de FSH.)

Si el ovocito II no es fecundado, el cuerpo lúteo degenera, cesa la secreción de progesterona y se desprende la pared uterina. Con la disminución en el suero de los niveles de progesterona, la hipófisis secreta nuevamente FSH y el ciclo se repite. Sin embargo, si se produce la fecundación, el trofoblasto secreta una nueva hormona, **luteotrofina**, que hace que el cuerpo lúteo se mantenga activo y que se mantengan elevados los niveles séricos de progesterona. Por lo tanto, el ciclo menstrual permite la maduración periódica y la ovulación de ovocitos humanos, y permite que el útero se desarrolle periódicamente como un órgano capaz de nutrir a un organismo en desarrollo durante 9 meses.

SITIO WEB 19.14 **El reinicio de la meiosis de mamíferos (The reinitiation of mammalian meiosis).** La disrupción mediada por hormona de la comunicación entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean puede ser crítica en el reinicio de la meiosis en las hembras de mamíferos.

Ahora volvemos a donde comenzamos: se establece el estadio para que tenga lugar la fecundación. El gameto femenino y el espermatozoide mueren si no se encuentran. Como F. R. Lillie reconoció en 1919, "Los elementos que se unen son células individuales, cada una al borde de la muerte; pero por su unión se forma un individuo rejuvenecido, que constituye un nexo en el eterno proceso de la vida."

---

* Ésta es la razón por la que RU486 es utilizado para el control de la natalidad posconcepción. Se piensa que RU486 compite para el receptor de progesterona dentro del núcleo. RU486 puede unirse al sitio de progesterona en el receptor, y el complejo receptor RU486 parece formar heterodímeros con el receptor normal de progesterona que transporta progesterona. Cuando este complejo RU486-progesterona se une a los elementos potenciadores sobre el DNA de respuesta a la progesterona, se inhibe la transcripción desde estos sitios (Vegeto y col. 1992; Spitz y Bardin 1993).

Resumen: la línea germinal

1. Los precursores de los gametos –el espermatozoide y el gameto femenino– son las células germinales primordiales. Se forman fuera de las gónadas y migran hacia las gónadas durante el desarrollo.
2. En muchas especies, existe un plasma germinal característico. Éste a menudo contiene a las proteínas Oskar, Vasa y Nanos o los mRNA que los codifican.
3. En *Drosophila*, el plasma germinal se localiza en la región posterior del embrión y forma las células polares, las precursoras de los gametos. En las ranas, el plasma germinal se origina en la porción vegetal del ovocito.
4. En los anfibios, las células germinales migran sobre las matrices de fibronectina desde el intestino larval posterior hacia las gónadas. En los mamíferos, se observa una migración semejante y también pueden ser utilizados los caminos de fibronectina. El factor de célula madre es crítico en esta migración y las células germinales proliferan a medida que viajan.
5. En las aves, el plasma germinal se ve primero en la semiluna germinal. Las células germinales migran a través de los vasos sanguíneos, luego dejan los vasos sanguíneos y migran hacia las crestas genitales.
6. La migración de la célula germinal en *Drosophila* se produce en varias etapas que involucran translocación pasiva, repulsión desde el endodermo y atracción hacia las gónadas.
7. Antes de la meiosis, se replica el DNA y las cromátidas hijas resultantes se mantienen unidas en el cinetocoro. Los cromosomas homólogos están conectados a través del complejo sinaptonémico.
8. La primera división de la meiosis separa a los cromosomas homólogos. La segunda división de la meiosis escinde al cinetocoro y separa las cromátidas.
9. La decisión meiosis/mitosis en los nematodos está regulada por una proteína homóloga de Delta en la membrana de la célula del extremo distal. La decisión para que una célula germinal se convierta en espermatozoide o gameto femenino está regulada a nivel de la traducción del mensajero *fem-3*.
10. La meiosis espermatogénica en los mamíferos está caracterizada por la producción de cuatro gametos por meiosis y por la ausencia de detención de la meiosis. La meiosis ovogénica está caracterizada por la producción de un gameto por meiosis y por la detención en la primera profase meiótica permitiendo el crecimiento del gameto femenino.
11. En algunas especies, la meiosis es modificada de modo tal que se forma un gameto femenino diploide. Estas especies pueden producir una nueva generación partenogenéticamente, sin fecundación.
12. El gameto femenino no solo sintetiza numerosos componentes, sino que también absorbe material producido por otras células. Además, localiza muchas proteínas y mensajeros para especificar regiones del citoplasma, amarrándolos al citoesqueleto.
13. En *Xenopus* el ovocito se transcribe activamente durante la primera profase meiótica desde los cromosomas en escobilla.
14. En *Drosophila*, las células nodrizas producen mRNA que ingresan al ovocito en desarrollo. Cuál de estas células derivada de la célula germinal primordial se convierte en ovocito y cuál en célula nodriza está determinado por el fusoma y el patrón de divisiones.
15. En los mamíferos, las hormonas del ciclo menstrual integran el ciclo ovárico, el ciclo uterino y el ciclo cervical. Esta integración permite que el útero esté listo para recibir a un embrión poco después de que se produzca la ovulación.

Bibliografía citada

Ahringer, J. and J.- Kimble. 1991. Control of the sperm-oocyte switch in Caenorhabditis elegans hermaphrodites by the fem-3 3'-untranslated region. Nature 349: 346-348.

Ahringer, J., T. A. Rosenquist, D. N. Lawson and J. Kimble. 1992. The C elegans sex determining gene, fem-3, is regulated post-transcriptionally. EMBO J. 11:2303-2310.

Amikura, R., S. Kobayashi, H. Saito and M. Okada. 1996. Changes in subcellular localization of mtrRNA outside mitochondria in oogenesis and early embryogenesis of Drosophila melanogaster. Dev. Growth Diff: 38: 489-498.

Amikura, R., K. Hanyu, M. Kashikawa and S. Kobayashi. 2001. Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial RNA in polar granules of Drosophila embryos. Mech. Dev. 107: 97-104.

Anderson, R. and 8 others. 1999. Mouse primordial germ cells lacking β1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. Development 126: 1655-1664.

Anderson, R., T. K. Copeland, H. Scholer, J. Heasman and C. Wylie.2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. Mech. Dev. 91: 61-68.

Antczak, M., J. van Blerkom and A. Clark. 1997. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin, and transforming growth factor-β2 sequestration in a population of human ovarian follicle cells. Hum. Reprod 12:2226-2234.

Austin, J. and J. Kimble. 1987. GLP-I is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in C. elegans. Cell 51: 589-599.

Baker, T. G. 1970. Primordial germ cells. In C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Reproduction in Mammals, Vol. 1: Germ Cells and Fertilization. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-13.

Beers, W. H., S. Strickland and E. Reich. 1975. Ovarian plasminogen activator: Relationship to ovulation and hormonal regulation. Cell 6: 387-394.

Flickinger, R. A. and D. E. Rounds. 1956. The maternal synthesis of egg yolk proteins as demonstrated by isotopic and serological means. Biochem. Biophys. Acta 22: 38-72.

Forristall, C., M. Pondel, L. Chen and M. L. King. 1995. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. Development 121: 201-208.

Gabrielli, B., L. M. Roy and J. L. Maller. 1993. Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. Science 259: 1766-1769.

Garcia, J. E., G. S. Jones and G. L. Wright. 1981. Prediction of the time of ovulation. Fertil. Steril. 36: 308-315.

Gardner, R. L. 1982. Manipulation of development. In C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Embryonic and Fetal Development. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159-180.

Ginsburg, M. and H. Eyal-Giladi. 1987. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. Development 101: 209-219.

Godin, I. and C. C. Wylie. 1991. TGFβ1 inhibits proliferation and has a chemotactic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 113: 1451-1457.

Godin, I., C. Wylie and J. Heasman. 1990. Genital ridges exert long-range effects on primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development 108: 357-363.

Godin, I., R. Deed, J. Cooke, K. Zsebo, M. Dexter and C. C. Wylie. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature 352:807-809.

Graham, C. E. 1977. Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis. In M. I. Sherman (ed.), Concepts of Mammalian Embryogenesis. M.I.T. Press, Cambridge, MA, pp. 315-394.

Grant, P. 1953. Phosphate metabolism during oogenesis in Rana temporaria. J. Exp. Zool. 124: 513-543.

Greb, R. R., L. Kiesel, A. K. Selbmann, M. Wehrmann, G. D. Hodgen, A. L. Goodman and D. Wallwiener. 1999. Disparate actions of mifepristone (RU 486) on glands and stroma in the primate endometrium. Hum. Reprod. 14: 198-206.

Gurdon, J. B. 1976. The Control of Gene Expression in Animal Development. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Gutzeit, H. O. 1986. The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in Drosophila follicles. J. Cell. Sci. 80: 159-169.

Hall, D. H. and 7 others. 1999. Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of Caenorhabditis elegans: Relationship between the germ line and soma. Dev. Biol. 212: 101-123.

Heasman, J., T. Mohun and C. C. Wylie. 1977. Studies on the locomotion of primordial germ cells from Xenopus laevis in vitro. J. Embryol. Exp. Morphol. 42: 149-162.

Heasman, J., R. D. Hynes, A. P. Swan, V. Thomas and C. C. Wylie. 1981. Primordial germ cells of Xenopus embryos: The role of fibronectin in their adhesion during migration. Cell 27: 437-447.

Heath, J. K. 1978. Mammalian primordial germ cells. Dev. Mammals 3: 272-298.

Henderson, S. T., D. Gao, E. J. Lambie and J. Kimble. 1994. Lag-2 may encode a signaling ligand of Glp- 1 and Lin- 12 receptors of C elegans. Development 120: 2913-2924.

Hill, R. S. and H. C. MacGregor. 1980. The development of lampbrush chromosome-type transcription in the early diplotene oocytes of Xenopus laevis: An electron microscope analysis. J. Cell Sci 44: 87-101.

Hirsh, D., D. Oppenheim and M. Klass. 1976. Development of the reproductive system of Caenorhabditis elegans. Dev. Biol. 49: 200-219.

Hodgkin, J., T. Doniach and M. Shen. 1985. The sex determination pathway in the nematode Caenorhabditis elegans: Variations on a theme. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 50: 585-593.

Hogan, B. 2002. Decisions, decisions! Nature 418: 282-283.

Howard, K. 1998. Organogenesis: Drosophila goes gonadal. Curr. Biol. 8: R415-R417.

Huarte, J., D. Belin, A. Vassalli, S. Strickland and J.-D. Vassalli. 1987. Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. Genes Dev. 1: 1201-1211.

Humphrey, R. R. 1931. Studies of sex reversal in Ambystoma. III. Transformation of the ovary of A. tigrinum into a functional testis through the influence of a testis resident in the same animal. J. Exp. Zool. 58: 333-365.

Ikenishi, K., T. S. Tanaka and T. Komiya. 1996. Spatio-temporal distribution of the protein of the Xenopus vasa homologue (Xenopus vasa-like gene-l, XVrGI) in embryos. Dev. Growth Diff 38: 527-535.

Inoue, H. and T. Hiroyoshi. 1986. A maternal-effect sex-transformation mutant of the house-fly, Musca domestica L. Genetics 112: 469-481.

Jaglarz, M. K. and K. R. Howard. 1995. The active migration of Drosophila primordial germ cells. Development 121: 3495-3503.

Jongens, T. A., B. Hay, L. Y. Jan and Y. N. Jan. 1992. The germ cell-less gene product: A posteriorly localized component necessary for germ cell development in Drosophila. Cell 70: 569-584.

Kammerman, S. and J. Ross. 1975. Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation. J. Clin. Endocrinol. 41: 546-550.

Kashikawa, M., R. Amikura, A. Nakamura and S. Kobashi. 1999. Mitochondrial small ribosomal RNA is present on polar granules in early cleavage embryos of Drosophila melanogaster. Dev. Growth Diff: 41: 495-502.

Kawasaki, I., Y.-H. Shim, J. Kirschner, J. Kaminker, W. B. Wood and S. Strome. 1998. PGL-I, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in C. elegans. Cell 94: 635-645.

Kimble, J. E. 1981. Strategies for control of pattern formation in Caenorhabditis elegans. Phil. Trans. R. Soc. Lond. [B] 295: 539-551.

Kimble, J. E. and J. G. White. 1981. Control of germ cell development in Caenorhabditis elegans. Dev. Biol. 81: 208-219.

Kimble, J., M. K. Barton, T. B. Schedl, T. A. Rosenquist and J. Austin. 1986. Controls of postembryonic germ line development in Caenorhabditis elegans. In J. Gall (ed.), Gametogenesis and the Early Embryo. Alan R. Liss, New York, pp. 97-110.

Kloc, M. and L. Etkin. 1995. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in Xenopus oocytes. Development 121: 287-297.

Kloc, M., G. Spohr and L. Etkin. 1993. Translocation of repetitive RNA sequen-

ces with the germ plasm in Xenopus oocytes. Science 262: 1712-1714.

Kloc, M., C. Larabell and L. Etkin. 1996. Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of Xenopus oocytes. Dev. Biol. 180: 119-130.

Kloc, M., C. Larabell, A. P. Y. Chan and L. D. Etkin. 1998. Contributions of METRO pathway localized molecules to the organization of the germ cell lineage. Mech. Dev. 75: 81-93.

Kloc, M. and 7 others. 2002. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of Xenopus. Dev. Biol. 241: 79-93.

Kobayashi, S. and M. Okada. 1989. Restoration of pole-cell forming ability to UV-irradiated Drosophila embryos by injection of mitochondrial lrRNA. Development 107: 733-742.

Kobayashi, S., R. Amikura and M. Okada. 1993. Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of Drosophila melanogaster. Science 260: 1521-1524.

Kobayashi, S., M. Yamada, M. Asaoka and T. Kitamura. 1996. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila. Nature 380: 708-711.

Koos, R. D. and M. R. Clark.1982. Production of 6-keto-prostaglandin Fla by rat granulosa cells in vitro. Endocrinology 111: 1513-1518.

Kraemer, B., S. Crittenden, M. Gallegos, G. Moulder, R. Barstead, J. Kimble and M. Wickens. 1999. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in Caenorhabditis elegans. Curr. Biol. 9: 1009-1018.

Kuwana, T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. Dev. Growth Diff: 35: 237-243.

Kuwana, T., H. Maeda-Suga and T. Fujimoto. 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. Anat. Rec. 215: 403-406.

Lawson, K. A. and 7 others. 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev. 13: 424-436.

Leatherman, J. L., L. Levin, J. Boero and T. A. Jongens. 2002. Germ cell-less acts to repress transcription during the establishment of the Drosophila germ cell lineage. Curr. Biol. 12: 1681-1685.

Lemaire, W. J., N. S. T. Yang, H. H. Behram and J. M. Marsh. 1973. Preovulatory changes in concentration of prostaglandin in rabbit Graafian follicles. Prostaglandins 3: 367-376.

Lillie, F. R. 1919. Problems of Fertilization. University of Chicago Press, Chicago.

Lin, H. and A. C. Spradling. 1995. Fusome asymmetry and oocyte determination in Drosophila. Dev. Genet. 16: 6-12.

Lira, A. A., R. A. Kinloch, S. Mortillo and P. A. Wassarman. 1990. An upstream region of the mouse ZP3 gene directs expression of firefly luciferinase specifically to growing oocytes in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 7215-7219.

Liu, C. K. and N. J. Berrill.1948. Gonophore for mation and germ cell origin in Tubularia. J. Morphol. 83: 390.

Lorca, T., F. H. Cruzalegui, D. Fesquet, J.-C. Cavadore, J. Méry, A. Means and M. Dorée. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertiliation of Xenopus eggs. Nature 366: 270-273.

Mahowald, A. P. 1971a. Polar granules of Drosophila. III. The continuity of polar granules during the life cycle of Drosophila. J. Exp. Zool. 176: 329-343.

Mahowald, A. P. 1971b. Pola granules of Drosophila. IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis. J. Exp. Zool. 176: 329-343.

Mahowald, A. P., J. H. Caulton and W. J. Gehring. 1979. Ultrastructural studies of oocytes and embryos derived from female flies carrying the grandchildless mutation in Drosophila subobscura. Dev. Biol. 69: 11132.

Martin, E. 1992. The Woman in the Body: A Cultural Analysis of Reproduction. Beacon Press, Boston.

Matsui, Y. 1974. A cytostatic factor in amphibian: Its extraction and partial characterization. J. Exp. Zool. 187: 141-147.

Matsui, Y., D. Toksoz, S. Nishikawa, S.-I. Nishikawa, D. Williams, K. Zsebo and B. L. M. Hogan. 1991. Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature 353: 750-752.

Matsui, Y., K. Zsebo and B. L. M. Hogan. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell 70: 841-847.

Matsumoto, Y. and J. L. Maller. 2002. Calcium, caimodulin and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in Xenopus egg extracts. Science 295: 499-502.

Maurice, J. 1991. Improvements seen for RU- 486 abortions. Science 254: 198-200.

Mayer, D. B. 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. Dev. Biol. 10: 154-190.

McLaren, A.1983. Does the chromosomal sex of a mouse cell affect its development? Symp. Brit. Soc. Dev. Biol. 7: 225-227.

Mendez, R., L. E. Hake, T. Andresson, L. E. Litepage, J. V. Ruderman and J. D. Richter. 2000. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. Nature 404: 302-307.

Meng, X. and 13 others. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatognia by GDNF. Science 287: 1489-1493.

Mintz, B. 1957. Embryological development of primordial germ cells in the mouse: Influence of a new mutation. J. Embryol. Exp. Morphol. 5: 396-403.

Moens, P. B. 1969. The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in Locusta migratoria. Chromosoma 28: 1-25.

Molyneaux, K. A., J. Stallock, K. Schaible and C. Wylie.2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. Deu Biol. 240: 488-498.

Moore, L. A., H. T. Broihier, M. Van Doren, L. B. Lunsford and R. Lehmann. 1998. Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in Drosophila. Development 125: 667-678.

Moses, M. J. 1968. Synaptonemal complex. Annu. Rev. Genet. 2: 363-412.

Mowry, K. L. and D. A. Melton. 1992. Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in Xenopus oocytes. Science 255: 991-994.

Miiller, F., V. Bernard and H. Tobler. 1996. Chromatin diminution in nematodes. BioEssays 18: 133-138.

Nakamura, A., R. Amikura, M. Mukai, S. Kobayashi and P. F. Lasko. 1996. Requirement for a noncoding RNA in Drosophila polar granules for germ cell establishment. Science 274: 2075-2079.

Parte IV *Ramificaciones adicionales de la biología del desarrollo*



Los factores ambientales pueden alterar el desarrollo. Cuando las larvas de los parásitos trematodos ingresan en el campo de la extremidad posterior de los renacuajos en desarrollo, dividen a estos campos. Las células dentro de los campos separados se regulan para formar dos o más extremidades que vienen desde el mismo lugar. La incapacidad para rechazar a estos parásitos puede implicar la exposición del renacuajo a contaminantes o a radiación ultravioleta. (Figura 16-3 cortesía del Dr. S. Sessions.)

Capítulo 20 Una perspectiva general sobre el desarrollo de las plantas

La búsqueda para las diferencias o contrastes fundamentales... ha ocupado muchas mentes de hombres, mientras que la búsqueda de la comunidad de principios o de semejanzas esenciales ha sido perseguida por pocos; los contrastes que están a punto de avecinarse son demasiado grandes, ellos pueden ser grandes pensamientos.
D'ARCY THOMPSON (1942)

No apagues tu inspiración y tu imaginación; no te conviertas en el esclavo de tu modelo.
VINCENT VAN GOGH

LAS PREGUNTAS FUNDAMENTALES en biología del desarrollo son similares para plantas y animales. Sus estrategias de desarrollo, que han evolucionado durante millones de años, tienen muchos elementos en común; sin embargo, algunos de los desafíos y soluciones halladas en plantas son suficientemente únicos como para justificar una discusión separada en este capítulo.

El término *planta* sin excesivo rigor abarca a muchos organismos, desde algas a plantas con flores (angiospermas). Mientras que este capítulo está centrado primariamente sobre las plantas con flores, sus estrategias de desarrollo se entienden mejor en un contexto evolutivo. Recientes estudios filogenéticos muestran un linaje común para todas las plantas verdes, bien diferenciadas de las plantas rojas y pardas (fig. 20-1). Las plantas de tierra firme o de vida terrestre tienen sus orígenes en las algas verdes de agua dulce (específicamente las carófitas), y la transición a terrestre se correlaciona con la evolución de un embrión cada vez más protegido. Musgos, helechos, gimnospermas (coníferas, cicadáceas, ginkgos) y angiospermas (plantas con flores) todos se desarrollan desde embriones protegidos. Dos ejemplos de protección de embriones son la cubierta protectora de la semilla o cubierta seminal, que apareció primero en los gimnospermas, y el fruto que caracteriza a las angiospermas. Como se ha visto, la protección del embrión es también un tema en el desarrollo animal. ¿Cuál es la diferencia fundamental entre animales y plantas de tierra firme?

1. **Las células de las plantas no migran.** Las células de las plantas están atrapadas dentro de rígidas paredes de celulosa que, generalmente, evitan la migración celular y de los tejidos. Las plantas, como la mayor parte de los animales metazoos, desarrollan tres sistemas básicos de tejidos (dérmico, fundamental y vascular), pero no dependen de la gastrulación para establecer este sistema estratificado de tejidos. El desarrollo de las plantas está regulado altamente por el ambiente, una estrategia que es adaptativa para un organismo estacionario.
2. **Las plantas tienen meiosis espórica en lugar de meiosis gamética.** Esto significa que en las plantas, mediante meiosis, se producen esporas, no gametas. Las gametas son producidas por divisiones mitóticas seguidas de meiosis.
3. **El ciclo de vida de las plantas terrestres (así como el de muchas otras plantas) incluye estadios multicelulares diploide y haploide.** Este tipo de ciclo de vida es referido como **alternancia de generaciones** y resulta en dos planes corporales multicelulares diferentes sobre el ciclo de vida de un individuo. La tendencia evolutiva ha sido hacia una reducción en tamaño de la generación haploide.
4. **Las células germinales no son separadas temprano en el desarrollo.** Mientras que éste es también el caso en varios filos animales, éste es el caso para todas las plantas.

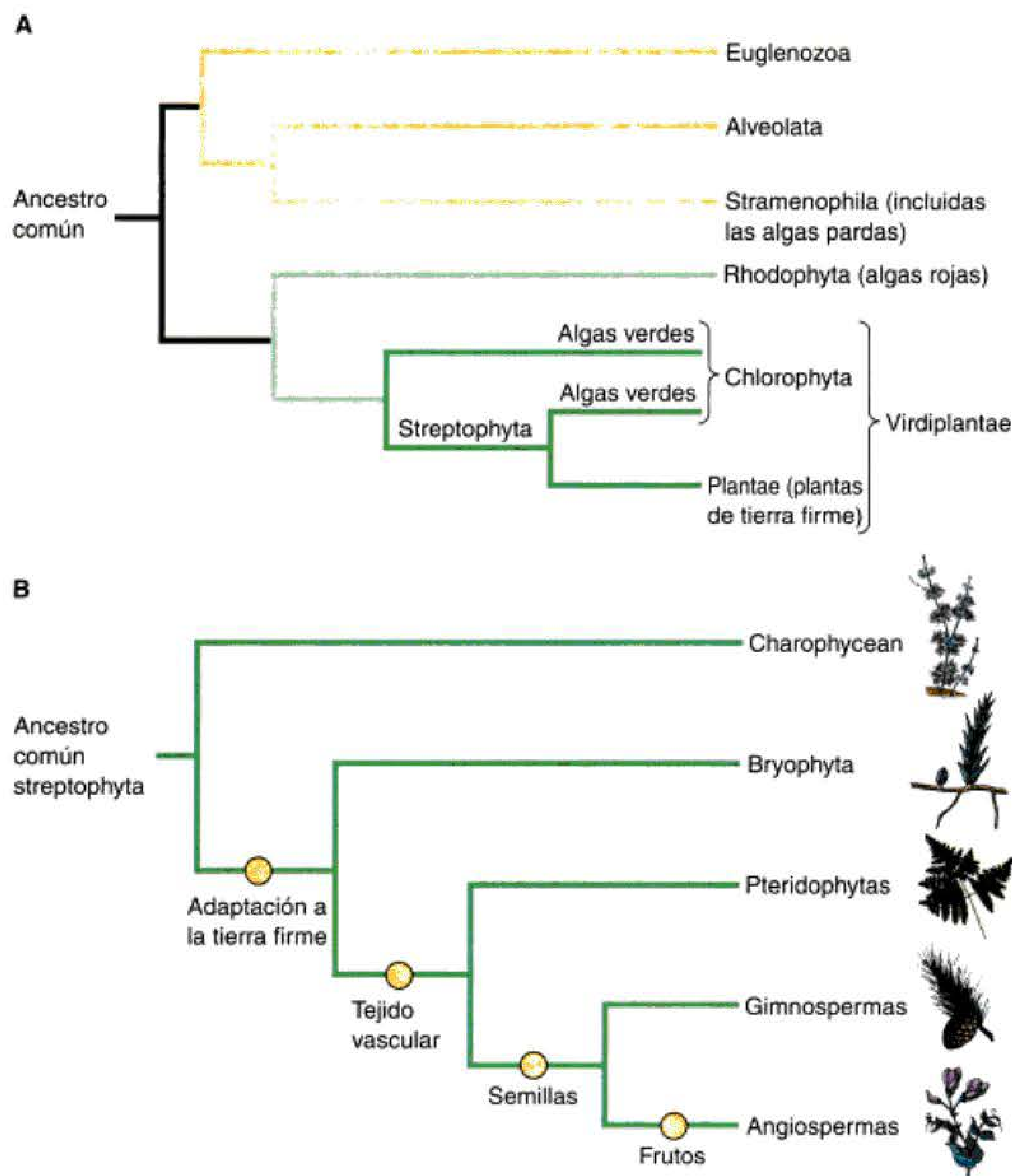


Fig. 20-1. Orígenes evolutivos de las plantas. **A.** Las plantas de tierra firme y las algas verdes están más estrechamente relacionadas entre sí de lo que lo están con las algas rojas y pardas. Las algas verdes no son monofiléticas, y solo una rama dio origen a las plantas de tierra firme. La Streptophyta es un linaje monofilético que incluye una línea de algas verdes, junto con los linajes multicelulares que una vez fueron considerados el reino Plantae. Se ha propuesto un nuevo reino, Virdiplantae, que incluye a todas las algas verdes y a las plantas de tierra firme. **B.** La adaptación a la tierra firme resultó en la evolución de un tejido vascular, semillas y frutos.

5. **Las plantas experimentan morfogénesis extendida.** Los grupos de células que se dividen activamente se denominan **meristemas**, los cuales son semejantes a las células madre en animales y persisten mucho tiempo después de la madurez. Los meristemas permiten el desarrollo reiterativo y la formación de nuevas estructuras a través de la vida de la planta.
6. **Las plantas tienen una enorme plasticidad de desarrollo.** Aunque la clonación en animales pone de manifiesto su plasticidad, las plantas dependen en gran medida de esta estrategia de desarrollo. Por ejemplo, si un retoño o brote es pastoreado por un herbívoro, los meristemas en la hoja crecen para reemplazar la parte perdida. (Esta estrategia tiene semejanzas con la regeneración vista en algunos animales.) Incluso pueden regenerar plantas enteras desde algunas células individuales. Además, la forma de una planta (que incluye ramificaciones, altura y cantidades relativas de estructuras vegetativa y reproductiva) es influenciada en gran medida por los factores ambientales tales como la luz y la temperatura, y desde el mismo genotipo puede resultar un amplio rango de morfologías. Este asombroso nivel de plasticidad puede ayudar a compensar la falta de movilidad de la planta.
7. **Las plantas son más tolerantes a la aneuploidía y a la poliploidía que los animales.** La aneuploidía y la poliploidía tienden a ser nocivas para el desarrollo de los animales. Cuando las plantas son aneuploides o poliploides, las consecuencias pueden ser adaptativas. Muchas flores halladas en la floristería y el trigo utilizado para la harina del pan son el resultado de poliploides exitosos. Cantidades enormes de DNA que "se incorporan," a menudo en forma de retrotransposones, también pueden explicar los aumentados genomas en plantas y animales. Por ejemplo, la mitad del genoma del maíz parece estar formado de DNA extranjero (SanMiguel y col. 1996). Las comparaciones de genomas completos de *Arabidopsis* (un sistema modelo de planta), del arroz, humanos y de ratones debería proporcionar una comprensión hacia los posibles significados de desarrollo (que incluye semejanzas o diferencias) de una extensa cantidad de DNA no codificante en plantas y animales (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000; Genome Internacional Sequencing Consortium 2001; Goff y col. 2002; Mouse Genome Sequencing Consortium 2002; Yu y col. 2002).
8. **Los mecanismos de desarrollo evolucionaron independientemente en plantas y animales.** La comparación a nivel del genoma indica que hay una homología mínima entre los genes y las proteínas utilizados para establecer los planes corporales en plantas y animales (Meyerowitz 2002). Aunque los genes de caja

Hox y MADS estaban presentes en el último ancestro común de plantas y animales, la familia de caja MADS controla muchos de los principales procesos regulatorios del desarrollo en plantas, pero no en animales. Sin embargo, los genes tipo Hox son reguladores importantes del desarrollo de las plantas y de los animales.

A pesar de las principales diferencias entre plantas y animales, los estudios de la genética del desarrollo están revelando algunos aspectos en común en la lógica de formación del patrón en los dos grupos, junto con distintas soluciones evolutivas al problema de la creación tridimensional de la forma desde una célula individual.

Ciclos de vida de las plantas

Las plantas tienen estadios multicelulares haploides y multicelulares diploides. El desarrollo embrionario solamente es visto en la generación diploide. Sin embargo, el embrión, es producido por la fusión de gametos, que son formados solamente por la generación haploide. La comprensión de la relación entre las dos generaciones es importante en el estudio del desarrollo de la planta.

En las plantas, las gametos se desarrollan en el **gametofito** (del griego *phyton*, que significa "planta") haploide multicelular. La fecundación da origen a un **esporofito** diploide multicelular, que produce esporas haploides mediante meiosis. Este tipo de ciclo de vida se denomina ciclo de vida **haplodiplonte** (fig. 20-2). Difiere del ciclo de vida **diplonte** de la mayoría de los animales, en que solo los gametos están en el estado haploide. En los ciclos de vida haplodiplontes, los gametos no son el resultado directo de una división meiótica. Las células esporofíticas diploides experimentan meiosis para producir **esporas** haploides. Cada espora luego atraviesa divisiones mitóticas para producir un gametofito haploide multicelular. Las divisiones mitóticas dentro del gametocito son requeridas para producir los gametos. Los esporofitos diploides resultan de la fusión de dos gametos. Entre las plantas, los gametofitos y los esporofitos de una especie tienen una morfología diferente (en algunas algas son parecidos). Cómo un único genoma puede ser utilizado para crear dos morfologías únicas constituye un interesante enigma.

Todas las plantas tienen alternancia de generaciones. Hay una tendencia evolutiva de los esporofitos que son nutricionalmente dependientes de los gametofitos autótrofos (alimentación por sí mismos) hacia lo opuesto, gametofitos que son dependientes de esporofitos autótrofos. Esta tendencia se ejemplifica al comparar los ciclos de vida de un musgo, un helecho y una angiosperma (véanse figs. 20-3 a 20-5). (Los ciclos de vida de las gimnospermas poseen muchas semejanzas con las de las angiospermas; las diferencias serán exploradas en el contexto desarrollo del angiosperma.)

El musgo de estructura "foliácea" sobre el bosque en el que caminamos es la generación de gametofitos de esta planta (fig. 20-3). Los musgos son **heterosporas**, lo que significa que producen dos tipos distintos de esporas; éstas se desarrollan en gametofitos masculinos y femeninos. Los gametofitos masculinos desarrollan estructuras reproductivas denominadas **anteridios** (singular, anteridio) que producen espermatozoides por mitosis. Los gametofitos femeninos desarrollan **arquegonios** (singular, arquegonio) que producen ovocélulas u oósferas por mitosis. Los espermatozoides que viajan a las plantas vecinas mediante gotas de agua, son atraídos químicamente a la entrada del arquegonio y se produce la fecundación.* El esporofito embrionario se desarrolla dentro del arquegonio, y el esporofito maduro se mantiene unido al gametofito. El esporofito no es fotosintético. Por lo tanto, el embrión y el esporofito maduro son nutridos por el gametofito. La meiosis dentro de la cápsula del esporofito produce esporas haploides que son liberadas y finalmente germinan para formar un gametofito macho.

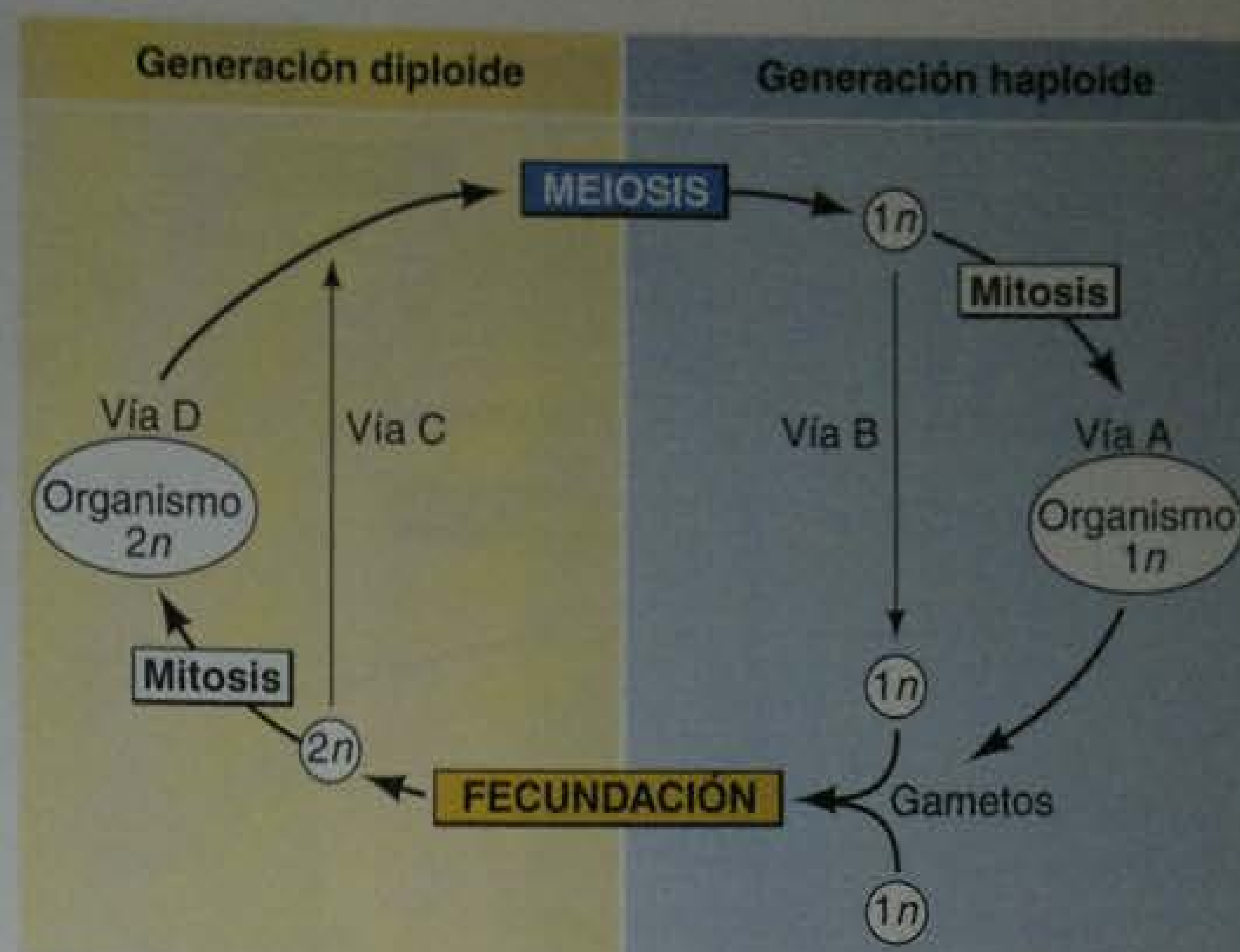


Fig. 20-2. Las plantas tienen ciclos de vida haplodiplointes que implican divisiones mitóticas (que resultan en multicelularidad) en las generaciones haploide y diploide (vías A y D). La mayoría de los animales es diplóntico y experimenta mitosis solamente en la generación diploide (vías B y D). Los organismos multicelulares con ciclos de vida haplónticos siguen las vías A y C.

Los helechos siguen un patrón de desarrollo similar al de los musgos, aunque la mayor parte (pero no todos) de los helechos son **homosporas**. Esto es, el esporofito produce solo un tipo de espora dentro de una estructura denominada el **esporangio** (fig. 20-4). Un único gametofito puede producir órganos sexuales masculinos y femeninos. El mayor contraste entre los musgos y los helechos es que el gametofito y el esporofito del helecho fotosintetizan y son, por lo tanto, autótrofos; está teniendo lugar el cambio hacia una generación esporofito dominante.†

Podría parecer a primera vista que las angiospermas tienen un ciclo de vida diploide debido a que la generación de gametofitos ha sido reducida solo a unas pocas células (fig. 20-5). Sin embargo, las divisiones mitóticas

* ¿Alguna vez se ha preguntado por qué no hay árboles de musgos? Aparte del hecho de que los gametofitos de los hongos (y otras plantas) no tienen la estructura de soporte y el sistema de transporte necesarios para alcanzar la altura del árbol, debería ser muy difícil para un espematozoide nadar hacia arriba en un árbol.

† Es posible tener árboles de helechos por dos razones. En primer lugar, el gametofito se desarrolla sobre la tierra, donde el agua puede facilitar la fecundación. En segundo lugar, a diferencia de los hongos, el esporofito del helecho tiene tejido vascular, que proporciona los sistemas de soporte y de transporte necesarios para alcanzar una altura considerable.

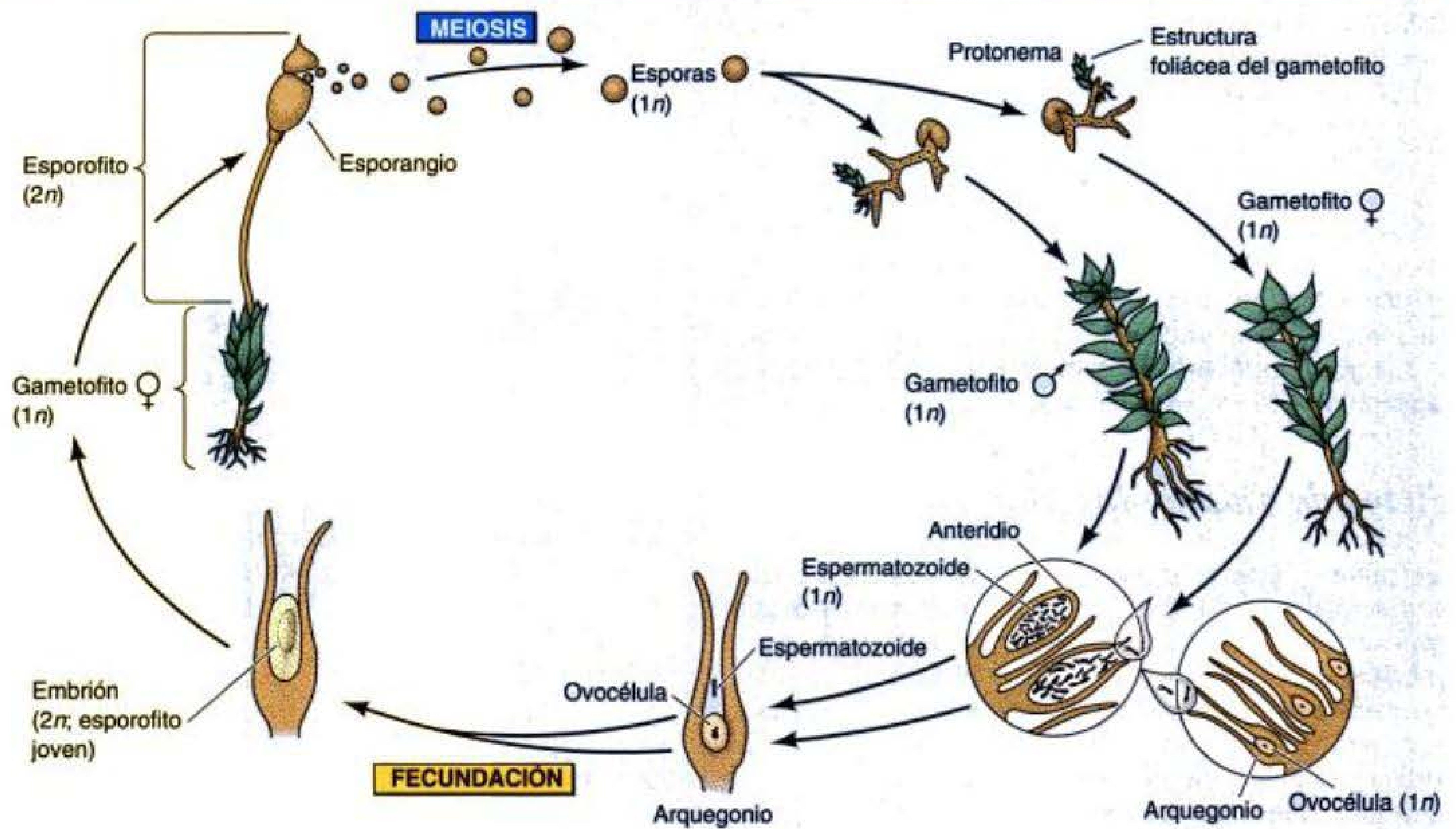
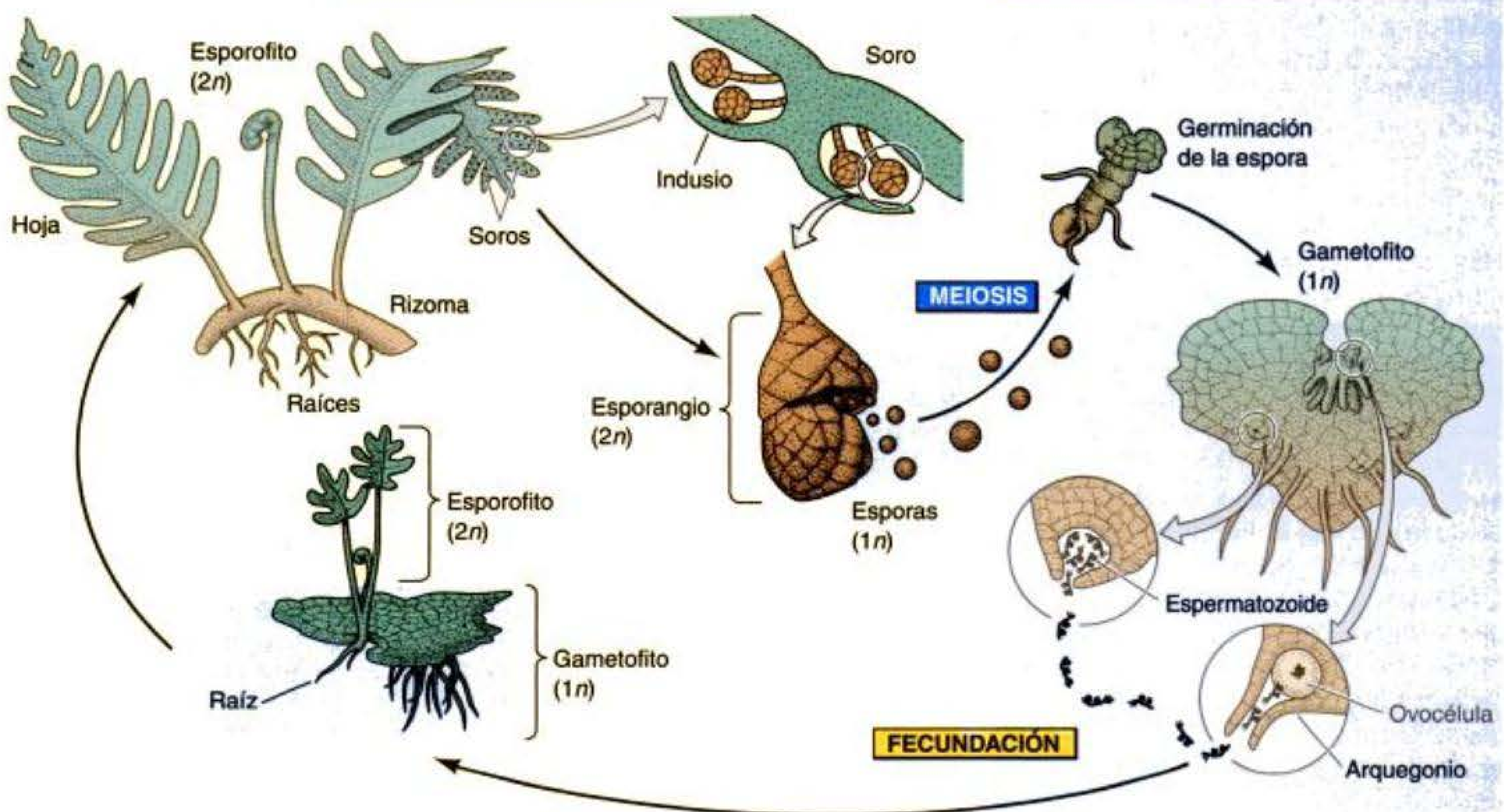


Fig. 20-3. Ciclo de vida de un musgo (género *Polytrichum*). La generación del esporofito depende del gametofito fotosintético para su nutrición. Las células dentro del esporangio experimentan meiosis para producir esporas masculinas y femeninas, respectivamente. Estas esporas se dividen mitóticamente para producir gametofitos multicelulares masculinos y femeninos. La diferenciación del extremo en crecimiento de los gametofitos produce anteridios en los machos y arquegonios en las hembras. Los espermatozoides y las ovocélulas son producidos mitóticamente en el anteridio y en el arquegonio, respectivamente. Los espermatozoides son transportados hacia los arquegonios en gotas de agua. Después de la fecundación, la producción del esporofito se desarrolla en el arquegonio y se mantiene adherido al gametofito femenino.



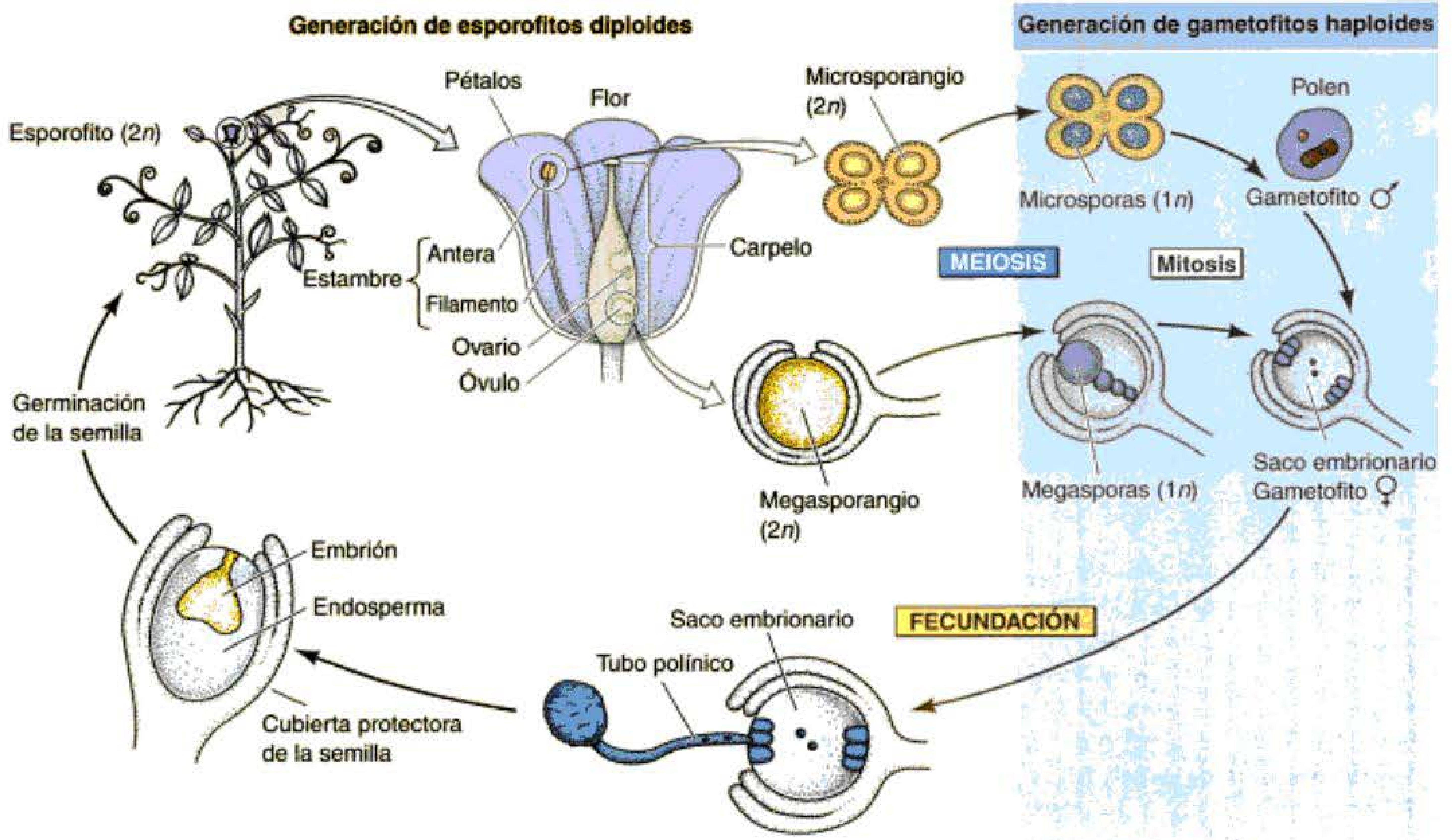


Fig. 20-5. Ciclo de vida de una angiosperma, representado aquí por una planta de arveja (guisante) (género *Pisum*). El esporofito es la generación dominante, pero los gametofitos multicelulares masculinos y femeninos se producen dentro de las flores del esporofito. Las células del microsporangio dentro de la antera experimentan meiosis para producir microsporas. Las posteriores divisiones mitóticas están limitadas, pero el resultado final es un grano de polen multicelular. El megasporangio está protegido por dos capas de tegumento y por la pared del ovario. Dentro del megasporangio, la meiosis produce cuatro megasporas: tres pequeñas y una grande. Solo sobrevivirá la megaspora más grande para producir el saco embrionario. La fecundación se produce cuando el polen germina y el tubo polínico crece hacia el saco embrionario. La generación de esporofitos puede ser mantenida en estado latente, protegida por la cubierta protectora de la semilla (o cubierta seminal).

todavía son seguidas de meiosis en el esporofito, lo que resulta en un gametofito multicelular, que produce ovocélulas o espermatozoides. Todo esto tiene lugar en el órgano que caracteriza a las angiospermas: la flor. Los gametofitos masculino y femenino tienen distintas morfologías (es decir, las angiospermas son heterosporas), pero las gametas que ellas producen no dependen del agua para la fecundación. En su lugar, el viento o miembros del reino animal distribuyen el gametofito masculino –**polen**– hacia el gametofito femenino. Otra innovación evolutiva hallada en las gimnospermas y en las angiospermas es la producción de una cubierta protectora de la semilla, que agrega un capa extra de protección alrededor del embrión. Una capa protectora más, el fruto, es única en las angiospermas y ayuda en la dispersión por el viento o los animales de los embriones que encierra.

El resto de este capítulo proporciona una exploración detallada del desarrollo del angiosperma desde la fecundación a la senescencia. Se debe tener en mente que el ciclo de vida haplodiplonte básico visto en los musgos y helechos es también hallado en las angiospermas, que continúan la tendencia hacia la nutrición incrementada y la protección del embrión.

Fig. 20-4. Ciclo de vida de un helecho (género *Polypodium*). La generación de esporofitos es fotosintética y es independiente del gametofito. Los esporangios están protegidos por una capa de células denominada el indusio. La estructura en conjunto se denomina soro. La meiosis dentro de los esporangios produce una espora haploide. Cada espora se divide mitóticamente para producir un gametofito con forma de corazón, que diferencia arquegonio y anteridio sobre un individuo. El gametofito es fotosintético e independiente, aunque es más pequeño que el esporofito. La fecundación tiene lugar cuando el agua está disponible para que el espermatozoide pueda nadar hacia el arquegonio y fecundar las ovocélulas. El esporofito tiene tejido vascular y raíces; el gametofito no los posee.

Producción de gametos en angiospermas

Como en aquellos de los musgos y helechos, los gametos de las angiospermas son producidos por la generación de gametofitos. Los gametofitos de las angiospermas están asociados con flores. Los gametos que ellas producen se unen para formar el esporofito. El estudio del desarrollo embrionario en plantas es, por esta razón, el estudio del desarrollo del esporofito temprano. En las angiospermas, el esporofito es el que es frecuentemente visto como el cuerpo de la planta. El meristema del vástago (yema, retoño o brote) del esporofito produce una serie de estructuras vegetativas. En un cierto punto en el desarrollo, las

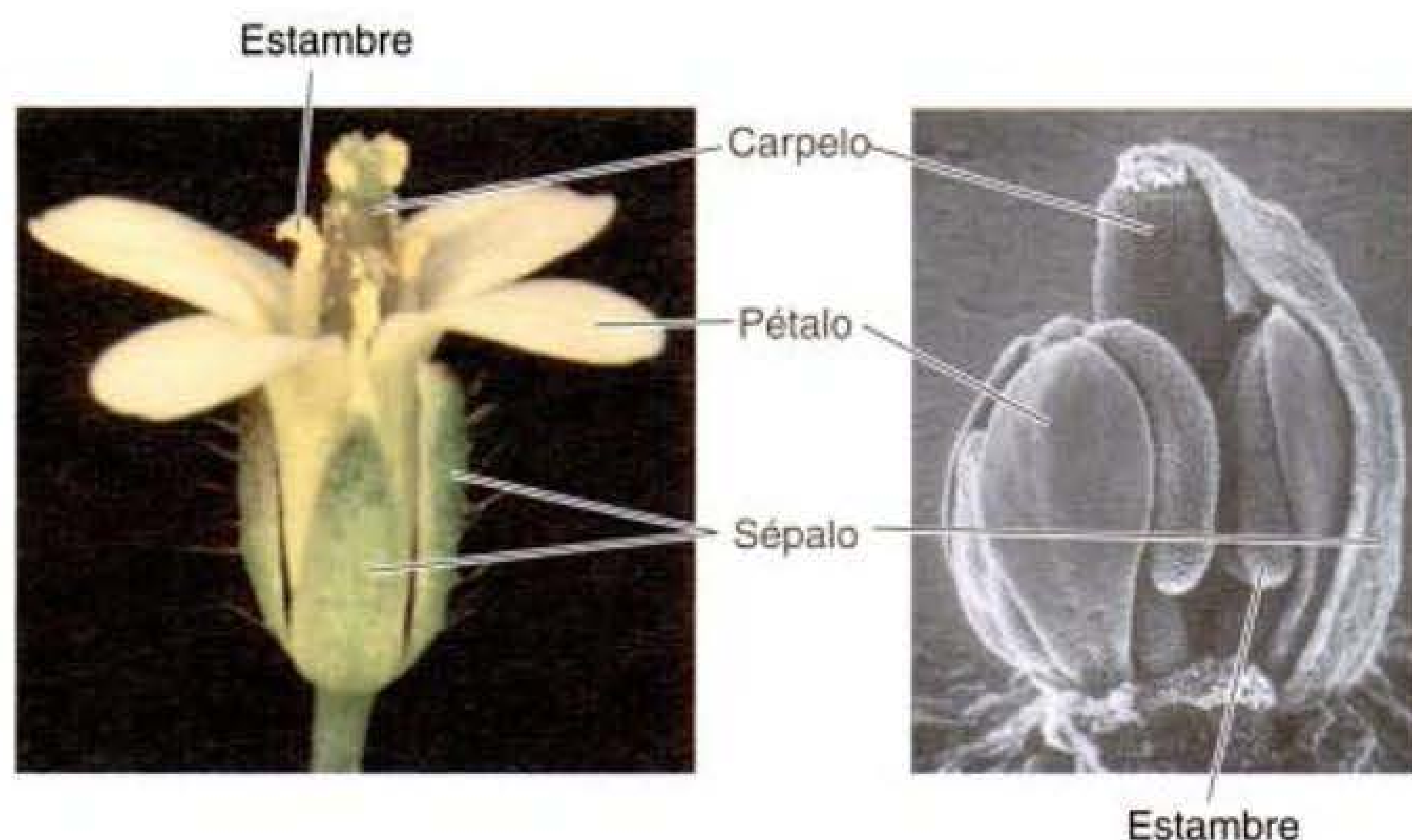


Fig. 20-6. Una flor de *Arabidopsis*, que muestra los principales órganos (pétalo, sépalo, estambre y carpelo) de una típica flor de angiosperma. La microfotografía sobre la derecha muestra la flor disecada. Son posibles enormes variaciones morfológicas en los cuatro órganos; esta variación parece estar relacionada con estrategias reproductivas. (Fotografías cortesía de J. Bowman.)

señales internas y externas desencadenan un cambio desde un desarrollo vegetativo hacia uno reproductivo (que produce flores) (véanse revisiones por McDaniel y col. 1992, Levy y Dean 1998, y Simpson y col. 1999).

Una vez que el meristema se vuelve floral, inicia secuencialmente el desarrollo de las partes florales en verticilos de órganos modificados a partir de hojas (fig. 20-6). El primero y el segundo verticilo se convierten en **sépalos** y **pétalos**, respectivamente; estos órganos son estériles. Los **estambres** que producen polen son iniciados en el tercer verticilo de la flor. El **carpelo** en el cuarto verticilo contiene el gametofito femenino. Los estambres contienen cuatro grupos de células, denominados **microsporangios** (sacos de polen), dentro de una **antera**. Los microsporangios experimentan meiosis para producir **microsporas**. A diferencia de la mayor parte de los helechos, las angiospermas son heterosporas, de modo que el prefijo *micro* es utilizado para identificar las esporas que produce mitóticamente el gametofito masculino: granos de polen. La pared interna del saco de polen, el **tapete**, proporciona nutrición para el polen en desarrollo.

Polen

El grano de polen es una estructura multicelular extremadamente simple. La pared externa del grano de polen, la **exina**, está compuesta de material resistente proporcionado por el tapetum (generación del esporofito) y la microspora (generación del gametofito). La pared interna, la **intina**, es producida por la microspora. Un grano de polen maduro consiste de dos células, una dentro de la otra (fig. 20-7). La **célula del tubo** contiene una **célula generativa** dentro de ésta. La célula generativa se divide para producir dos espermatozoides. El núcleo de la célula del tubo guía la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (o de polinización) después que el polen aterriza sobre el estigma de un gametofito femenino. Uno de dos espermatozoides se fusionará con la ovocélula para producir la siguiente generación de esporofito. El segundo espermatozoide participará en la formación del endosperma, una estructura que proporciona nutrición para el embrión.

El ovario

El cuarto verticilo de órganos dentro de la flor forma el **carpelo**, que da origen al gametofito femenino (fig. 20-8). El carpelo consiste en el **estigma** (donde aterriza el polen), el **estilo** y el **ovario**. Luego de la fecundación, la pared del ovario se desarrollará hacia el **fruto**. Esta estructura única del angiosperma proporciona una protección adicional para el embrión en desarrollo y también potencia la dispersión de la semilla por los frugívoros (animales que se alimentan de frutos). Dentro del ovario hay uno o más **óvulos** adheridos a la pared del ovario por una **placenta**. Los óvulos completamente desarrollados se denominan **semillas**. El óvulo tiene una o dos capas externas de células denominadas **tegumentos**. Estos encierran al **megasporangio**, que contiene las células de esporofito que experimentan la meiosis para producir **megasporas** (véase fig. 20-5). Hay una pequeña abertura en los tegumentos, denominada el **micropilo**, a través

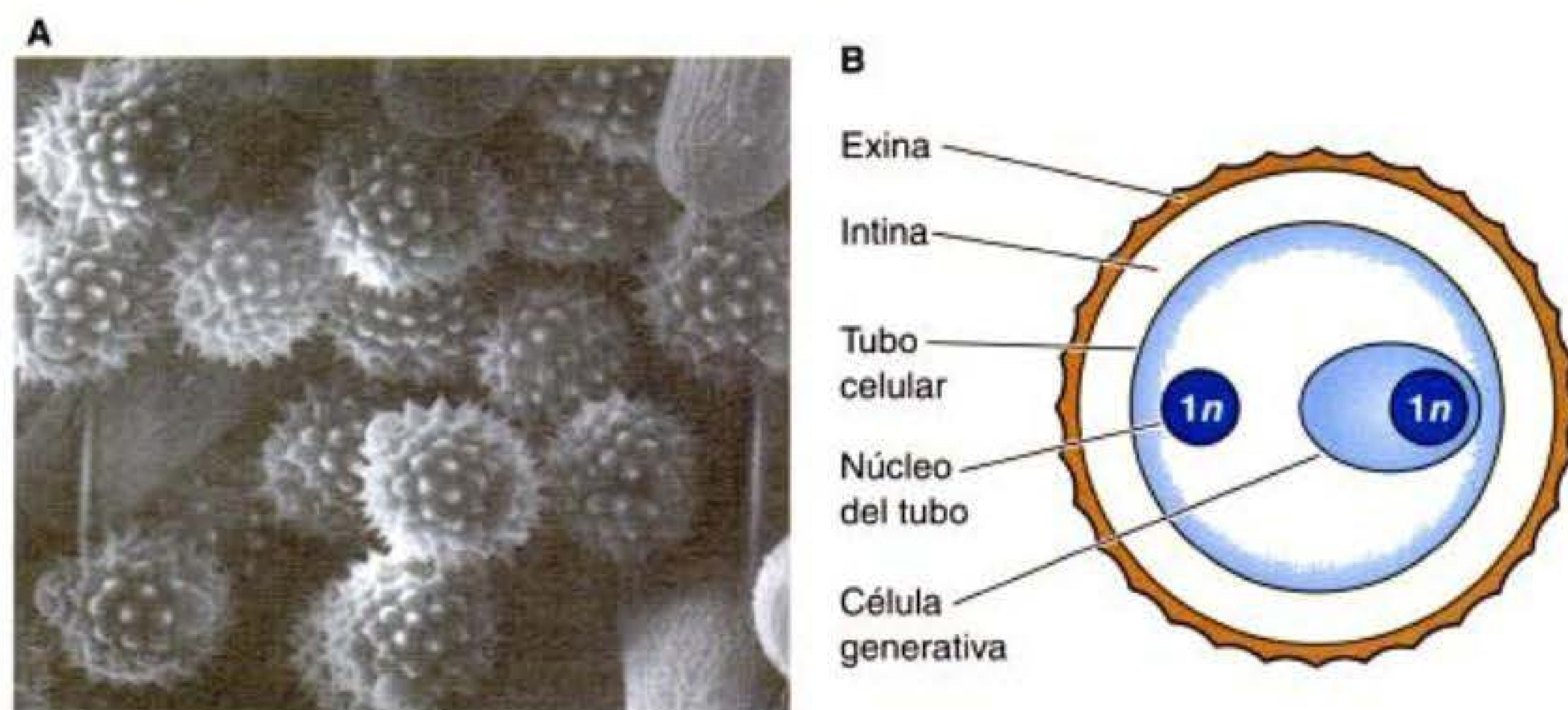


Fig. 20-7. A. Los granos de polen tienen patrones superficiales complicados, como se observa en esta microfotografía electrónica de barrido de un polen espinoso. **B.** Un grano de polen consiste en una célula dentro de una célula. La célula generativa experimentará divisiones para producir dos células de espermatozoides. Una fecundará a la ovocélula y la otra se unirá con los núcleos polares, produciendo el endosperma.

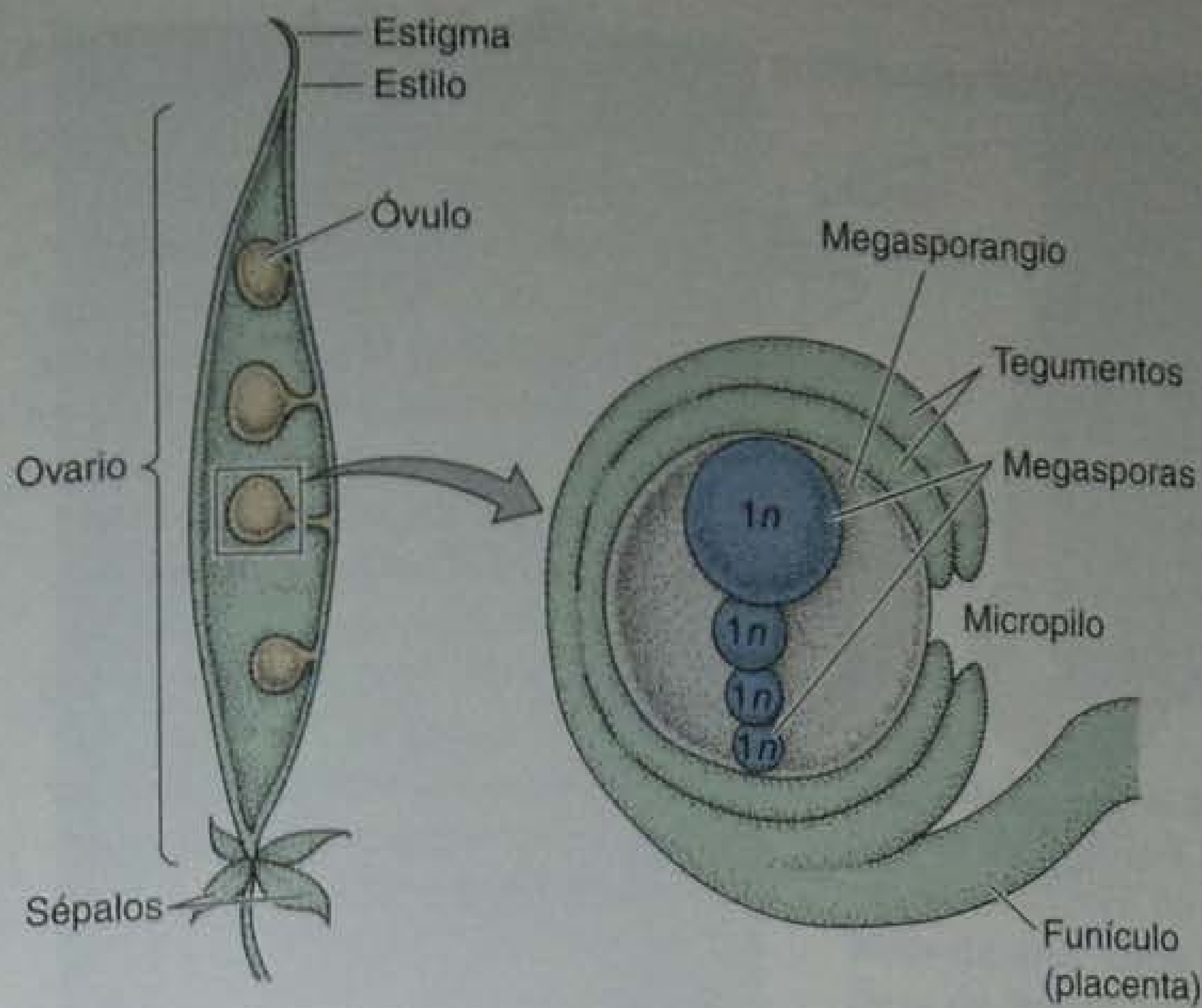


Fig. 20-8. El carpelo contiene uno o más óvulos; éstos contienen megasporangios protegidos por dos capas de células tegumentarias. Los megasporangios se dividen meióticamente para producir megasporas haploides. Todo el carpelo es diploide excepto para las megasporas, que se dividen mitóticamente para producir el saco embrionario (el gametofito femenino).

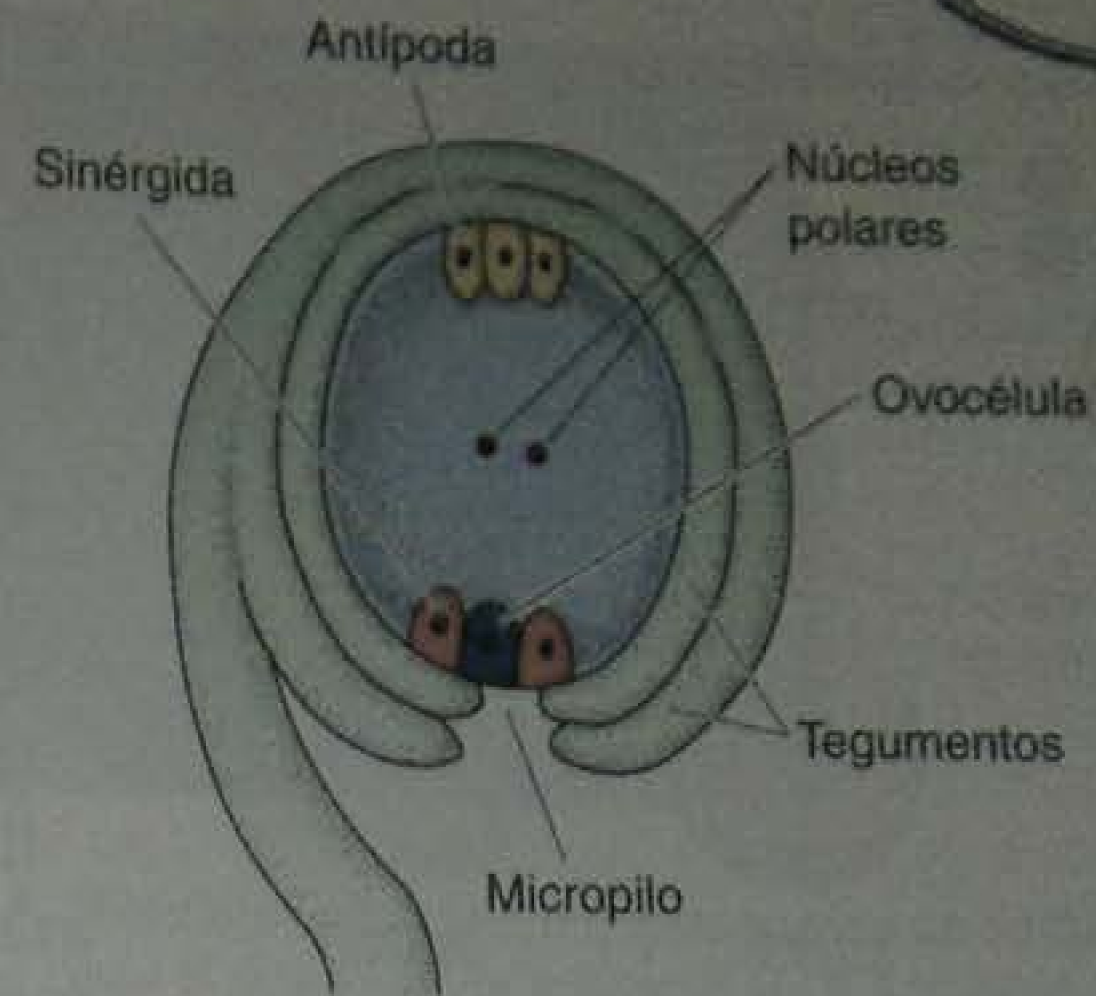


Fig. 20-9. El saco embrionario es el producto de tres divisiones mitóticas de la megaspora haploide. Dos de los núcleos están contenidos dentro de la célula central; las otras seis células contienen un núcleo haploide cada una.

de la cual crecerá el tubo polínico. Los tegumentos –una innovación que apareció primeramente en las gimnospermas– desarrollan la **cubierta protectora de la semilla o cubierta seminal**, que protege al embrión al proporcionar una barrera física impermeable. Cuando el embrión maduro se dispersa desde la planta progenitora, el tejido esporofítico diploide acompaña al embrión en la forma de una cubierta protectora de la semilla y el fruto.

Dentro del óvulo, la meiosis y una citocinesis desigual producen cuatro megasporas. La más grande de estas megasporas experimenta tres divisiones mitóticas para producir un **saco embrionario** de 7 células con 8 núcleos (fig. 20-9). Una de estas células es la ovocélula. Las dos **células sinérgidas** que rodean a la ovocélula pueden ser restos evolutivos del arquegonio (el órgano sexual visto en los hongos y helechos). La **célula central** contiene dos o más **núcleos polares**, que se fusionarán con el segundo núcleo del espermatozoide y se desarrollan hacia el endosperma poliploide. Las tres **células antípodas** se forman en el extremo opuesto de las sinérgidas del saco embrionario y degeneran antes del desarrollo embrionario o durante su transcurso. Estas células no tienen función conocida. Los análisis genéticos del desarrollo gametofítico femenino en el maíz y en *Arabidopsis** han proporcionado una comprensión sobre la regulación de las etapas específicas de este proceso (Drews y col. 1998).

Polinización

La **polinización** se refiere al aterrizaje y subsiguiente germinación del polen sobre el estigma. Por lo tanto, ésta implica una interacción entre la generación gametofítica masculina (el polen) y la generación esporofítica femenina (la superficie estigmática del carpelo). La polinización puede producirse dentro de una única flor (autofecundación) o el polen puede aterrizar sobre una flor diferente de la misma planta o de una diferente. Cerca del 96% de las especies de plantas con flores producen gametofitos masculinos y femeninos sobre la misma planta. Sin embargo, alrededor del 25% de éstas producen dos tipos de flores diferentes sobre la misma planta, en lugar de **flores perfectas** que contengan gametofitos masculinos y femeninos. Las flores con **estambres** carecen de carpelo, mientras que las flores con **carpelos** carecen de estambres. Las plantas de maíz, por ejemplo, tienen flores con estambres (borla) y con carpelos (espiga) sobre la misma planta. Tales especies son consideradas **monoicas** (del griego *mono*, "uno;" *oecos*, "casa"). El 4% de las especies restantes (sauces, por ejemplo) producen flores con estambres y carpelos en plantas separadas. Estas especies son consideradas **dioicas** ("dos casas"). Solo unas pocas especies de plantas tienen cromosomas sexuales verdaderos. Los términos "masculino" y "femenino" son aplicados correctamente en su mayor parte solo a la generación gametofítica de las plantas heterosporas, no al esporofito (Cruden y Lloyd 1995).

La llegada del grano de polen viable sobre un estigma receptivo no garantiza la fecundación. La **incompatibilidad interespecífica** se refiere al fracaso del polen de una especie para germinar y crecer sobre el estigma de otras especies (para una revisión, véase Taylor 1996). La **incompatibilidad intraespecífica** es la incompatibilidad que se produce dentro de una especie. La **autoincompatibilidad** –incompatibilidad entre el polen y los estigmas del mismo individuo– es un ejemplo de incompatibilidad intraespecífica. La autoincompatibilidad bloquea la fecundación entre dos gametos genéticamente semejantes, esto incrementa la probabilidad de nuevas combinaciones génicas al potenciar el cruzamiento externo (polinización por un individuo diferente de la misma especie). Los grupos de plantas estrechamente relacionadas pueden contener una mezcla de especies autocompatibles y autoincompatibles.

* Una pequeña hierba de la familia mostaza, *Arabidopsis* se utiliza como un sistema modelo debido a que su genoma es muy pequeño.

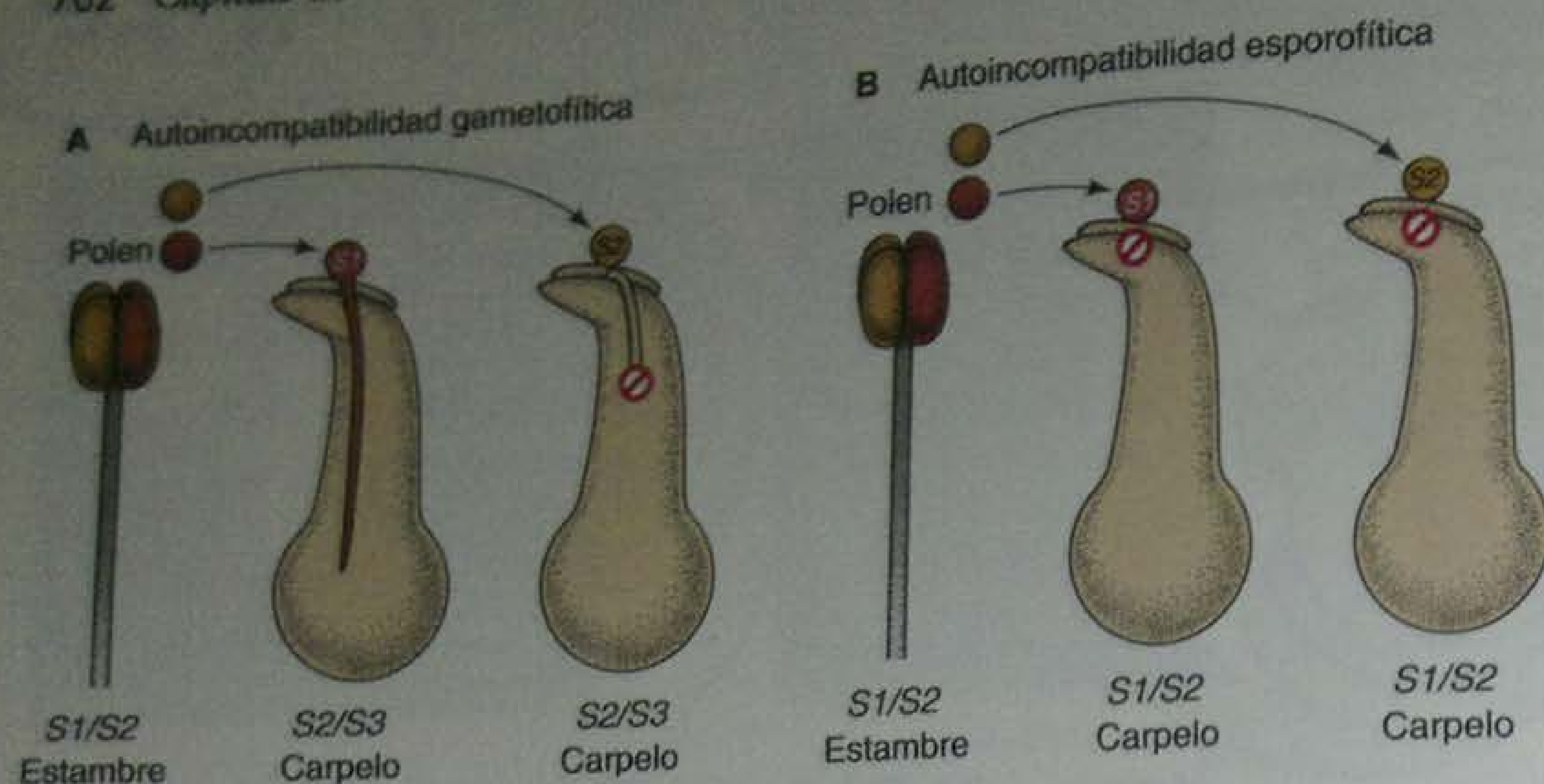


Fig. 20-10. Autoincompatibilidad. *S1*, *S2* y *S3* tienen alelos diferentes del locus (*S*) de autoincompatibilidad. **A.** Las plantas con autoincompatibilidad gametofítica rechazan el polen solamente cuando el genotipo del polen coincide con uno de los dos alelos del carpelo. **B.** En la autoincompatibilidad esporofítica, el genotipo del polen del progenitor, no solo el del grano de polen haploide mismo, puede desencadenar una respuesta de incompatibilidad.

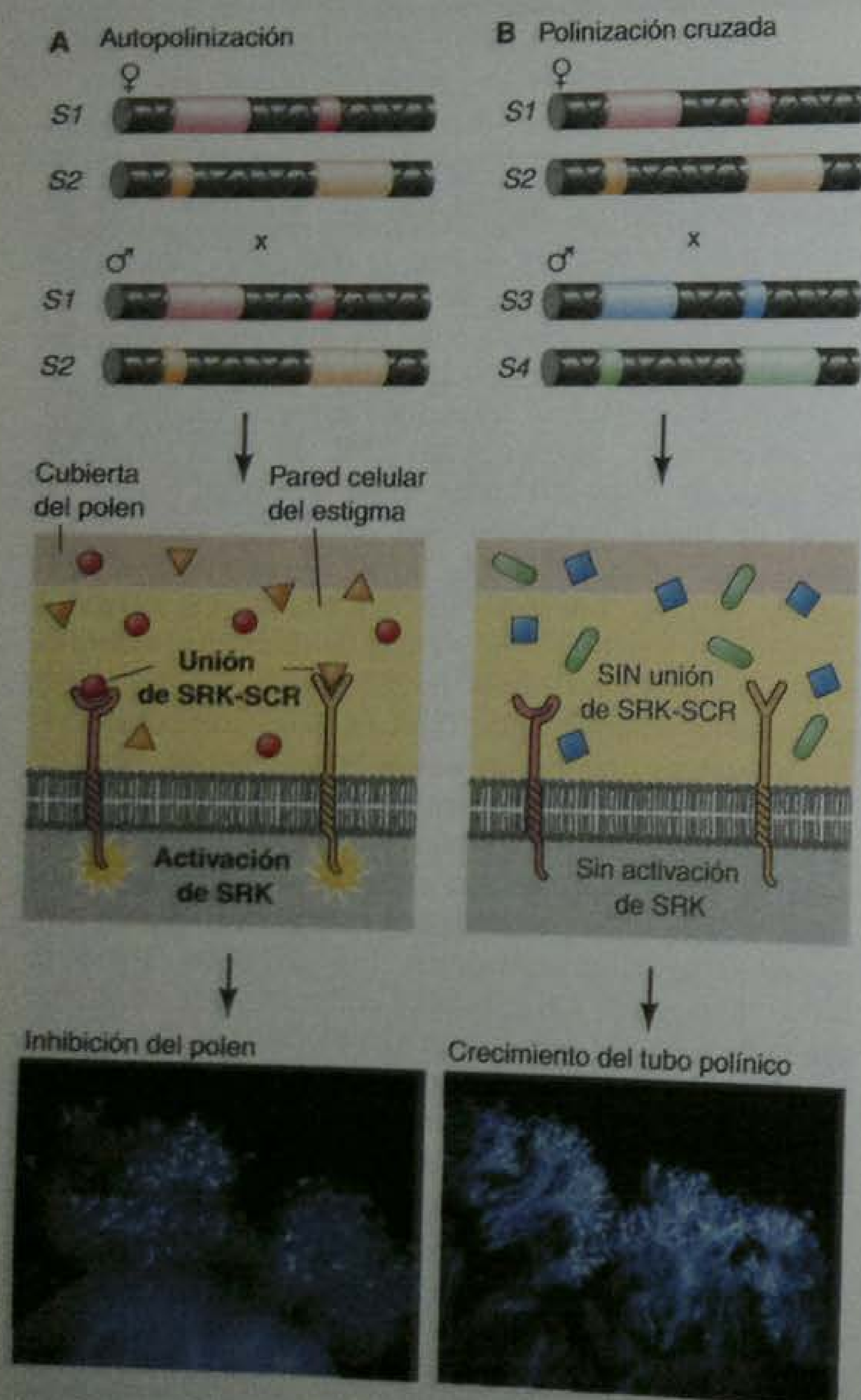


Fig. 20-11. El reconocimiento de lo propio mediante ligando-receptor es la clave de la autoincompatibilidad en *Brassica*. La variación alélica en los genes *SRK* y *SRC* lleva a una variedad de combinaciones posibles de ligandos y proteínas receptoras. A diferencia de otros sistemas de reconocimiento de lo propio (incluyendo inmunidad y apareamiento) la autoincompatibilidad resulta de la unión de las proteínas SRK y SRC del propio individuo (desde los loci *S* alélicos) en lugar de la no propia. (Según Nasrallah 2002, fotografías cortesía de June Nasrallah.)

Han evolucionado varios sistemas diferentes para la autoincompatibilidad (fig. 20-10). El reconocimiento de lo propio depende de la autoincompatibilidad multialélica del locus (*S*) (Dodds y col. 1996; Gaude y McCormick 1999; Nasrallah 2002). La autoincompatibilidad gametofítica se produce cuando el alelo *S* del grano de polen coincide con los alelos *S* del estigma (recordar que el estigma es parte de la generación de esporofitos diploides, que tienen dos alelos *S*). En este caso, el tubo polínico comienza a desarrollarse, pero se detiene antes de alcanzar el micropilo. La autoincompatibilidad esporofítica se produce cuando uno de los dos alelos *S* del esporofito que produce polen (no el gametofito) coincide con uno de los alelos *S* del estigma. Lo más probable es que la contribución del esporofito a la exina sea la responsable.

El locus *S* consiste en varios genes relacionados físicamente que regulan el reconocimiento y el rechazo del polen. Se ha clonado un gen *S* que codifica para una RNAsa (denominada RNAsa S), que en la petunia gametofíticamente autoincompatible el pistilo es suficiente para reconocer y rechazar el polen propio (Lee y col. 1994). El componente del polen reconocido por la RNAsa S es muy probablemente un gen diferente en el locus *S*, pero que todavía no ha sido identificado de manera positiva en plantas autoincompatibles gametofíticamente o esporofíticamente. En la autoincompatibilidad esporofítica, se piensa que un ligando sobre el polen se une a un receptor de cinasa unido a membrana en el estigma y comienza el proceso de señalización que lleva al rechazo del polen. En *Brassica*, una de las proteínas codificadas por los genes del locus *S* es una serino-treonina cinasa de transmembrana (SRK) que funciona en la epidermis del estigma y une un péptido del polen rico en cisteína (SCR) (fig. 20-11; Kachroo y col. 2001).

Hay numerosos ejemplos de poblaciones de plantas que han cambiado desde sistemas autoincompatibles hacia autofecundantes. Los cambios en el locus *S*, específicamente en los genes *SKR* y *SCR*, podrían explicar estos cambios evolutivos. Los Nasrallahs (Nasrallah y col. 2002) crearon plantas de *Arabidopsis thaliana* autoincompatibles (normalmente autocompatibles) mediante la introducción de los genes *SKR* y *SCR* que codifican proteínas de autoreconocimiento de *A. lyrata* (una especie autoincompatible). Este experimento demuestra que *A. thaliana* todavía tiene todos sus componentes corriente abajo de la cascada de la señal que puede llevar a la de-

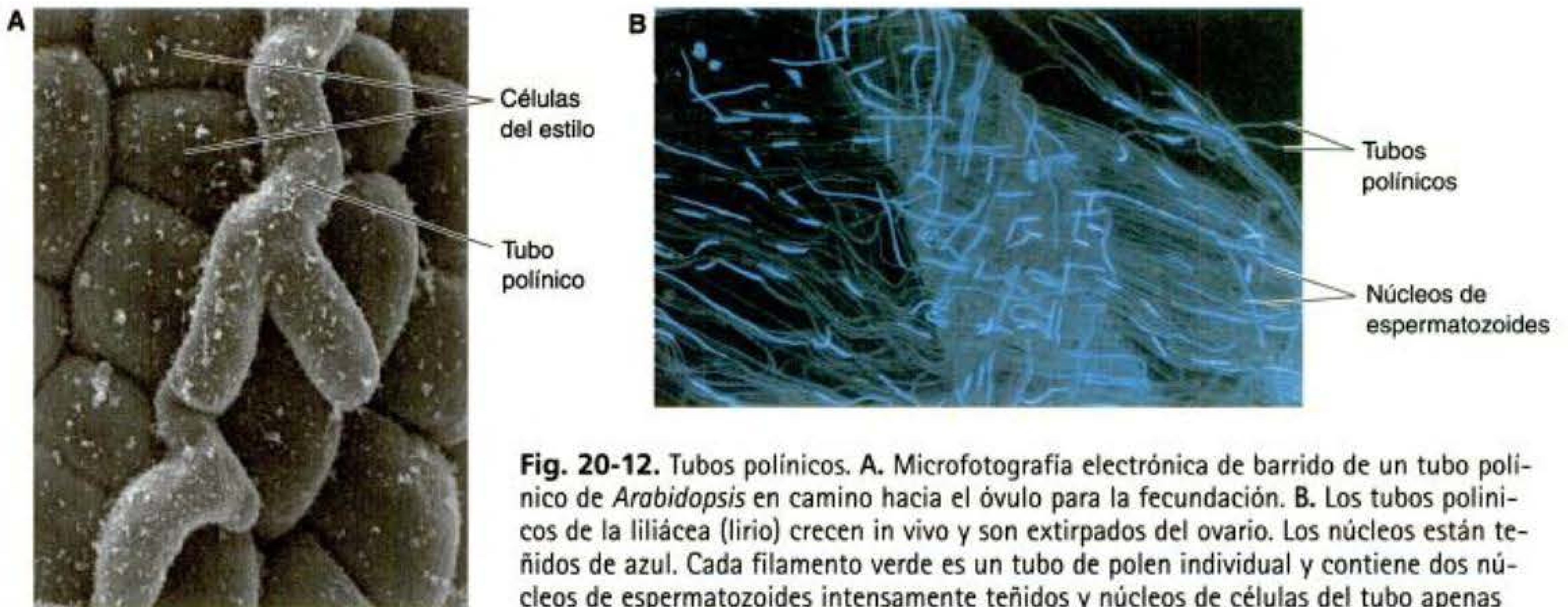


Fig. 20-12. Tubos polínicos. **A.** Microfotografía electrónica de barrido de un tubo polínico de *Arabidopsis* en camino hacia el óvulo para la fecundación. **B.** Los tubos polínicos de la liliácea (lirio) crecen in vivo y son extirpados del ovario. Los núcleos están teñidos de azul. Cada filamento verde es un tubo de polen individual y contiene dos núcleos de espermatozoides intensamente teñidos y núcleos de células del tubo apenas visibles. Obsérvese el enorme número de tubos polínicos, en su "carrera" para fecundar a una única ovocélula (y los núcleos polares). (Microfotografías cortesía de E. Lord.)

gradación del polen. El mecanismo de la degradación del polen no está claro, pero parece ser altamente específico.

Si el polen y el estigma son compatibles, el polen toma agua (se hidrata) y surge el tubo polínico. El tubo polínico crece bajando por el estilo del carpelo hacia el micropilo (fig. 20-12). El núcleo del tubo y las células de espermatozoides son mantenidos en el extremo en crecimiento mediante bandas de callos (un complejo de carbohidratos). Esto puede ser, posiblemente, una excepción a la regla de las "células de plantas que no se mueven," cuando la célula(s) generativa parece moverse hacia adelante mediante moléculas adhesivas (Lord y col. 1996). El crecimiento del tubo polínico es bastante lento (hasta un año) en las gimnospermas, mientras que en algunas angiospermas el tubo puede crecer tan rápido como 1 cm por hora.

Se sabe, desde hace mucho tiempo, que el calcio juega un papel esencial en el crecimiento del tubo polínico (Brewbaker y Kwack 1963). El calcio se acumula en el extremo del tubo polínico, donde los canales de calcio abiertos están concentrados (Jaffe y col. 1975; Trewavas y Malho 1998). Hay evidencia directa de que el tubo polínico que crece en la amapola del campo es regulado por una onda de calcio que se mueve lentamente controlada por la vía de señalización de fosfoinosítidos (fig. 20-13; Franklin-Tong y col. 1996). El influjo de calcio se produce en el extremo del tubo polínico y sobre el tallo, y cuando el tubo polínico es autoincompatible con el estilo se observa un influjo de calcio alterado (Franklin-Tong y col. 2002). Las investigaciones citoesqueléticas demuestran que el posicionamiento de las organelas durante el crecimiento del tubo del polen depende de interacciones con los componentes citoesqueléticos. Esto debería relacionarse con la señalización, pero todavía se desconocen las precisiones (Cai y Cresti 1999).

Las aproximaciones genéticas han sido utilizadas en las investigaciones de cómo el crecimiento del tubo polínico es guiado hacia los óvulos sin fecundar. En *Arabidopsis*, el tubo polínico parece ser guiado por una señal de largo alcance desde el óvulo (Hulskamp y col. 1995; Wilhelmi y Preuss 1999). Los análisis del crecimiento del tubo polínico en los óvulos mutantes de *Arabidopsis* indican que el saco embrionario haploide es particularmente importante en la guía de largo alcance del crecimiento del tubo polínico. Los mutantes con tejido esporofítico defectuoso en el óvulo pero un saco embrionario haploide normal parecen estimular el desarrollo normal del tubo polínico.

Mientras que la evidencia señala primariamente hacia el papel que tiene la generación de gametofitos en la guía del tubo polínico, las células diploides podrían hacer alguna contribución. Se han identificado dos genes de *Arabidopsis*, *POP2* y *POP3*, que guían específicamente a los tubos polínicos hacia el óvulo con ningún otro efecto aparente sobre la planta (Wilhelmi y Preuss 1996, 1999).

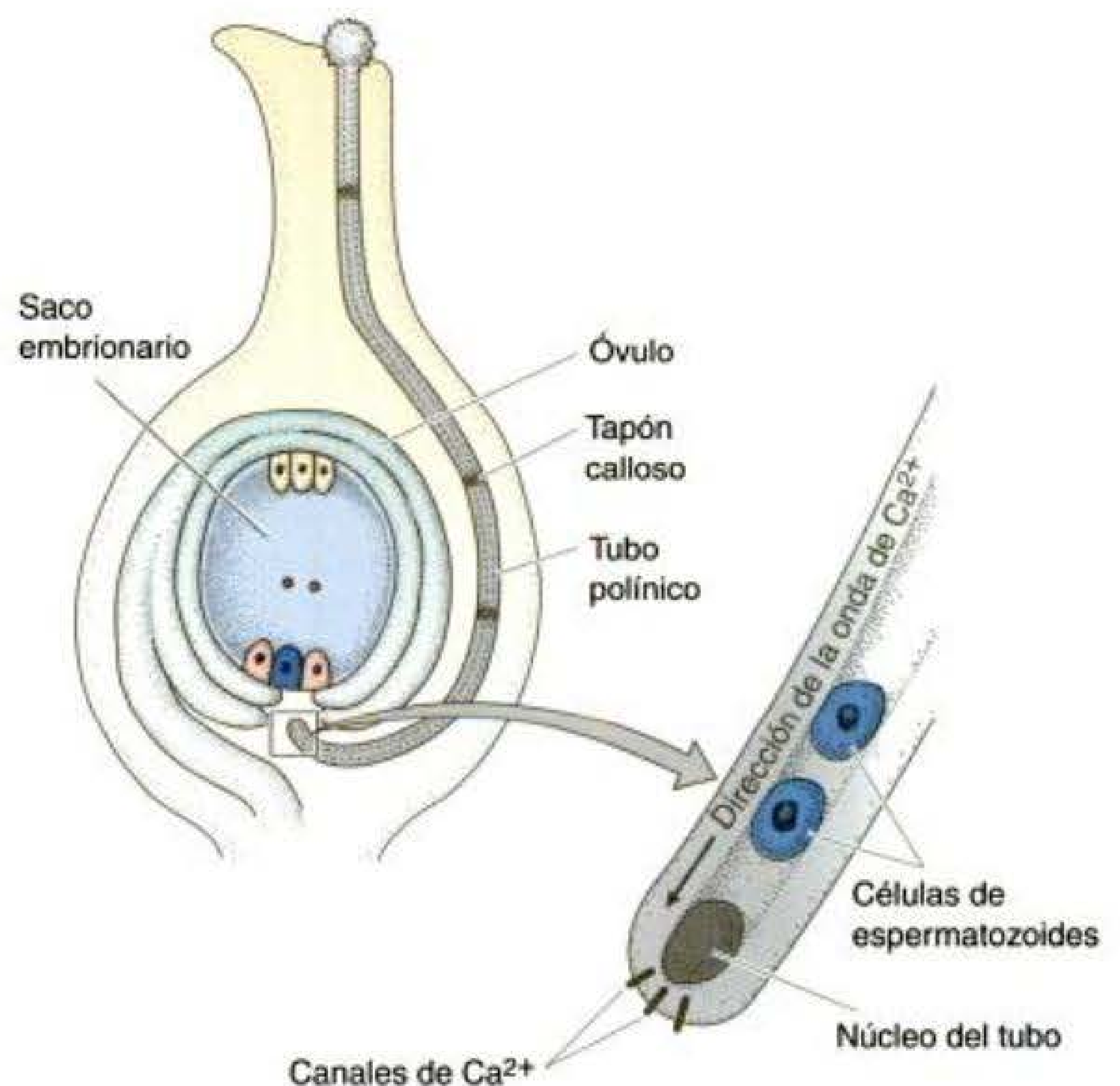


Fig. 20-13. Calcio y extremo de crecimiento del tubo de polen. Después que el polen compatible germina, el tubo de polen crece hacia el micropilo. El calcio desempeña un papel clave en el crecimiento del tubo. (Según Franklin-Tong y col. 1996.)



Fig. 20-14. *Amborella trichopoda.* Esta planta está más estrechamente relacionada con la primera angiosperma que cualquier otra especie extinta. (Fotografía cortesía de Sandra K. Floyd.)

Estas funciones de los genes en el polen y en el pistilo implican, por lo tanto, la generación de esporofitos en el sistema de guía.

Las dos células sinérgidas en el saco embrionario (véase fig. 20-15) pueden atraer al tubo polínico como paso final de la guía del polen. En *Torenia fournieri*, el saco embrionario protruye desde el micropilo y puede ser cultivado. In vitro, éste puede atraer a un tubo polínico. Higashiyama y col. (2001) utilizaron un haz de láser para destruir células individuales en el saco embrionario y luego analizaron si los tubos polínicos todavía eran atraídos hacia el saco embrionario o no. Cuando ambas sinérgidas fueron destruidas, el tubo polínico no era atraído hacia el saco embrionario, pero una única sinérgida fue suficiente para guiar a los tubos polínicos.

Fecundación

El tubo polínico en crecimiento ingresa en el saco embrionario a través del micropilo y crece a través de una de las sinérgidas. Se liberan los dos espermatozoides y se produce un acontecimiento de **doble fecundación** (revisión por Southworth 1996). Un espermatozoide se fusiona con la ovocélula, produciendo el cigoto que se desarrollará hacia el esporofito. El segundo espermatozoide se fusiona con la célula central binucleada o multinucleada, dando origen al **endosperma**, que nutre al embrión en desarrollo. Este segundo acontecimiento no es una fecundación verdadera en el sentido de gametos masculinos y femeninos que experimenten singamia (fusión). Esto significa que no da como resultado un cigoto, sino un tejido de apoyo nutricional. (Cuando se comen "palomitas de maíz o pororó," se está comiendo endosperma que se ha hecho estallar.) Las otras células accesorias en el saco embrionario degeneran después de la fecundación.

El cigoto de angiosperma produce solamente un único embrión; el cigoto de gimnosperma, por otra parte, produce dos o más embriones después de que comienza la división celular, mediante un proceso conocido como segmentación de la embriogénesis. La doble fecundación, identificada por primera vez un siglo atrás, está generalmente restringida a las angiospermas, pero ésta también ha sido hallada en las gimnospermas *Ephedra* y *Gnetum*, aunque no forman endospermas. Friedman (1998) ha sugerido que el endosperma puede haber evolucionado desde un segundo cigoto "sacrificado" como un suministro de alimento en una gimnosperma con doble fecundación. Las investigaciones del pariente existente más estrechamente relacionado de angiosperma basal, *Amborella*, deberían proporcionar información sobre el origen evolutivo del endosperma (fig. 20-14; Brown 1999). Un análisis de los sacos embrionarios de angiospermas basales existentes ha demostrado que existen las mismas posibilidades que la primera angiosperma tuviera un saco embrionario de 4 núcleos así como un saco embrionario de 8 núcleos (fig. 20-15; Williams y Friedman 2002). La célula crítica para considerar es la célula central, que es fecundada por el segundo espermatozoide para crear el endosperma. En el saco embrionario de 8 núcleos, hay siete células. La célula central contiene don núcleos y cuando es fecundada, produce un endosperma triploide. En *Nuphar*, una angiosperma basal, el saco embrionario consiste en cuatro núcleos y la célula central tiene un único núcleo que, cuando es fecundado, desarrolla un endosperma *2n*. El endosperma *2n* proporciona evidencia convincente de que el saco embrionario de 4 células en *Nuphar* no resulta de la degradación de

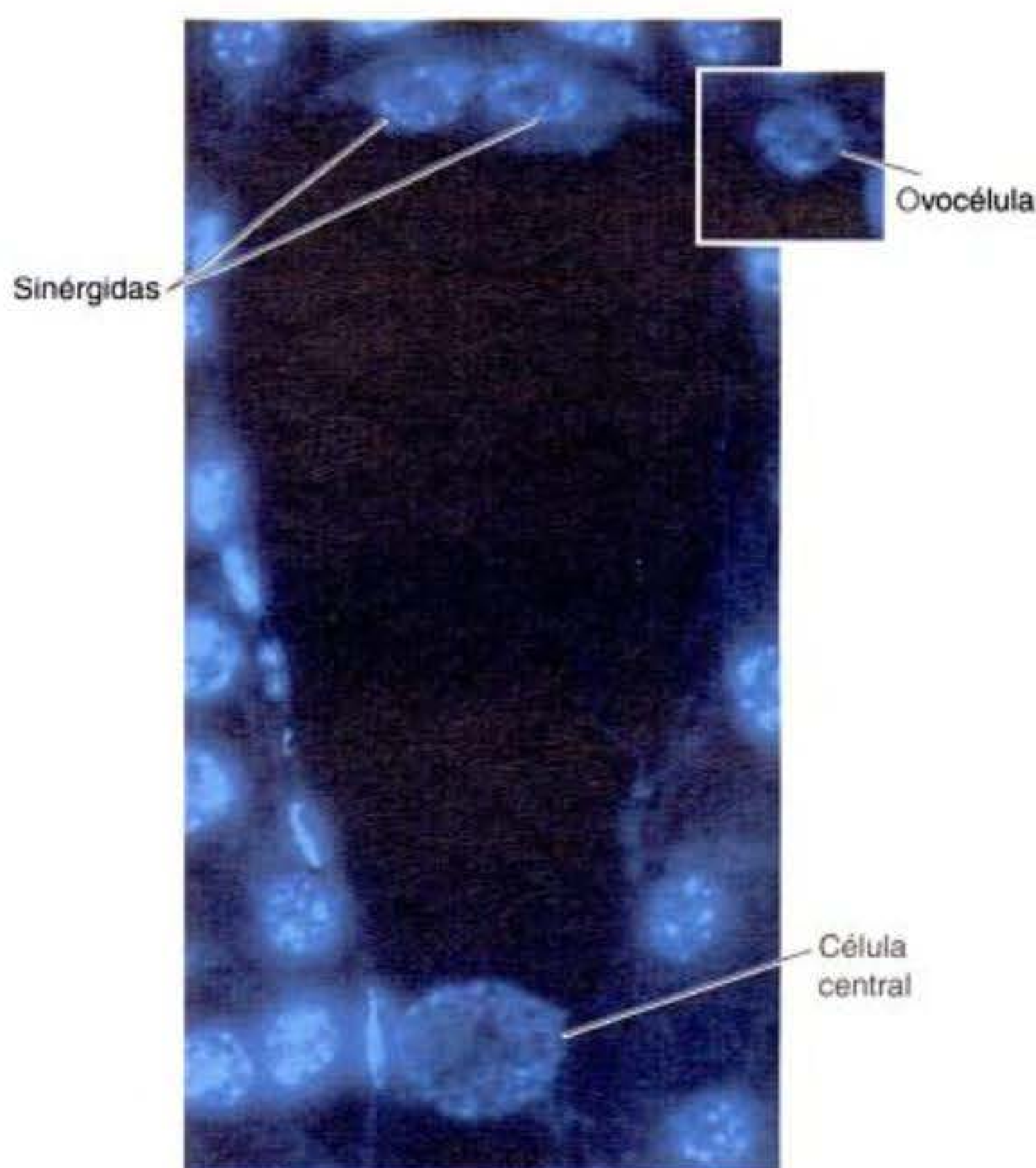


Fig. 20-15. Las angiospermas ancestrales pueden haber tenido endospermas 2*n*. El saco embrionario de *Nuphar* tiene un solo núcleo en su célula central que es fecundado para producir un endosperma 2*n*. La tinción de DAPI fue utilizada para mostrar que el contenido del DNA era 1*n*, no 2*n*. Debido a que ésta es una sección de tejido, la célula huevo está oculta detrás de dos sinérgidas y se muestra en el inserto. (De Williams y Freidman 2002; microfotografía cortesía de William Freidman.)

cuatro núcleos. Si otras células se hubieran degradado, se podría predecir un endosperma *3n*.

La fecundación no es un prerrequisito absoluto para el desarrollo embrionario de las angiospermas (Mogie 1992). Los embriones pueden formarse dentro del saco embrionario desde ovocélulas haploides y desde células que no se dividen meióticamente. Este fenómeno se denomina **apomixis** (del griego, "sin mezcla") y resulta en semillas viables. La viabilidad de los esporofitos haploides resultantes indica que la ploidía sola no explica las distinciones morfológicas entre el gametofito y el esporofito. Los embriones también pueden desarrollarse desde tejido esporofítico cultivado. Estos embriones se desarrollan sin endosperma asociado y carecen de cubierta protectora de la semilla.

Desarrollo embrionario

Estudios experimentales

El cigoto de la angiosperma está incluido dentro del óvulo y el ovario y, por lo tanto, no es de fácil acceso para la manipulación experimental. Sin embargo, las siguientes aproximaciones pueden proporcionar información sobre la formación del embrión de la planta:

- **Los estudios histológicos** de embriones a diferentes estadios muestran cómo la división celular cuidadosamente regulada genera la construcción de un organismo, aún sin la capacidad para mover células y tejidos para darle forma al embrión.
- **Los experimentos en cultivo** que utilizan embriones aislados desde óvulos y embriones que se desarrollan de novo desde tejido esporofítico cultivado proporcionan información sobre las interacciones entre el embrión, y el tejido esporofítico y el del endosperma que lo rodea.
- **Experimentos de fecundación in vitro** proporcionan información sobre las interacciones de los gametos.
- **Los análisis bioquímicos** de embriones a diferentes estadios de desarrollo proporcionan información sobre cosas como los productos génicos específicos de cada estadio necesarios para el establecimiento del patrón y de las reservas de alimento.
- **Los análisis genéticos y moleculares del desarrollo de los mutantes** caracterizados que utilizan las aproximaciones anteriormente mencionadas tienen mayor potencia para la comprensión del desarrollo embrionario.
- **El análisis clonal** involucra la marcación de células individuales y el seguimiento de su destino en el desarrollo (véase Poethig 1987 para detalles sobre la metodología). Por ejemplo, semillas heterocigotas para un gen de la pigmentación pueden ser irradiadas de modo tal que una cierta célula pierde la capacidad de producir pigmento. Sus descendientes formarán un sector sin color que puede ser identificado y relacionado con el patrón corporal general.

Embriogénesis

En las plantas, el término **embriogénesis** abarca el desarrollo desde el momento de la fecundación hasta que se produce el aletargamiento. El plan corporal básico del esporofito se establece durante la embriogénesis; sin embargo, este plan es repetido y elaborado después de que la dormición (dormancia o latencia) se ha roto. La embriogénesis presenta varios desafíos fundamentales.

1. Establecimiento del plan corporal básico. El establecimiento del patrón radial produce tres sistemas de tejidos, y la generación del patrón axial establece el eje apicobasal (yema-raíz).
2. Reservar el tejido meristemático para la elaboración posembrionaria de la estructura corporal (hojas, raíces, flores, etc.).
3. Establecer un reservorio de alimento accesible para la germinación del embrión hasta que se vuelva autotrófico.

La embriogénesis es similar en todas las angiospermas en términos del establecimiento del plan corporal básico (véase fig. 20-18; Steeves y Sussex 1989). Sin embargo, hay diferencias en el patrón de elaboración, incluyendo las diferencias en la precisión de los patrones de división celular, la extensión del desarrollo del endosperma, del desarrollo del cotiledón y la extensión del desarrollo del meristema del vástago (brote, retoño o yema) (Esau 1977; Johri y col. 1992).

La polaridad se establece en la primera división luego de la fecundación. El establecimiento de la polaridad ha sido investigado utilizando algas pardas como sistema modelo (Belanger y Quatrano 2000). Los cigotos de estas plantas son independientes de otros tejidos y dóciles para manipular. La división celular inicial genera una célula más pequeña, que formará el rizoide (homólogo de la raíz) y anclará el resto de la planta, y una célula grande, que dará origen al tallo (el cuerpo principal del esporofito). El punto de entrada del espermatozoide fija la posición del extremo del rizoide del eje apicobasal. Este eje es perpendicular al plano de la primera división celular, actina-F se acumula en el polo del rizoide (Kropf y col. 1999). Sin embargo, la luz o la gravedad pueden anular esta fijación del eje y establecer una nueva posición para la división celular (fig. 20-16; Alessa y Kropf 1999).

Una vez que se establece el eje apicobasal, las vesículas secretorias son dirigidas hacia el polo rizoide del cigoto (fig. 20-17). Estas vesículas contienen material para la evaginación del rizoide, con una pared celular de distinta composición macromolecular. La secreción dirigida también puede ayudar a orientar el primer plano de la división celular. El mantenimiento del rizoide en oposición al destino del tallo temprano en el desarrollo depende de la información en las paredes de la célula (Brownlee y Berger 1995). La información de la pared celular también parece ser importante en las angiospermas (revisión en Scheres y Benfey 1999).

El plan corporal básico de la angiosperma que se establece durante la embriogénesis también comienza con una división celular asimétrica,* que da origen a una **cé-**

* La división celular asimétrica también es importante en el desarrollo angiospérmico tardío, incluida la formación de las células de guarda del estoma de la hoja y de los diferentes tipos celulares en los tejidos fundamental y vascular.

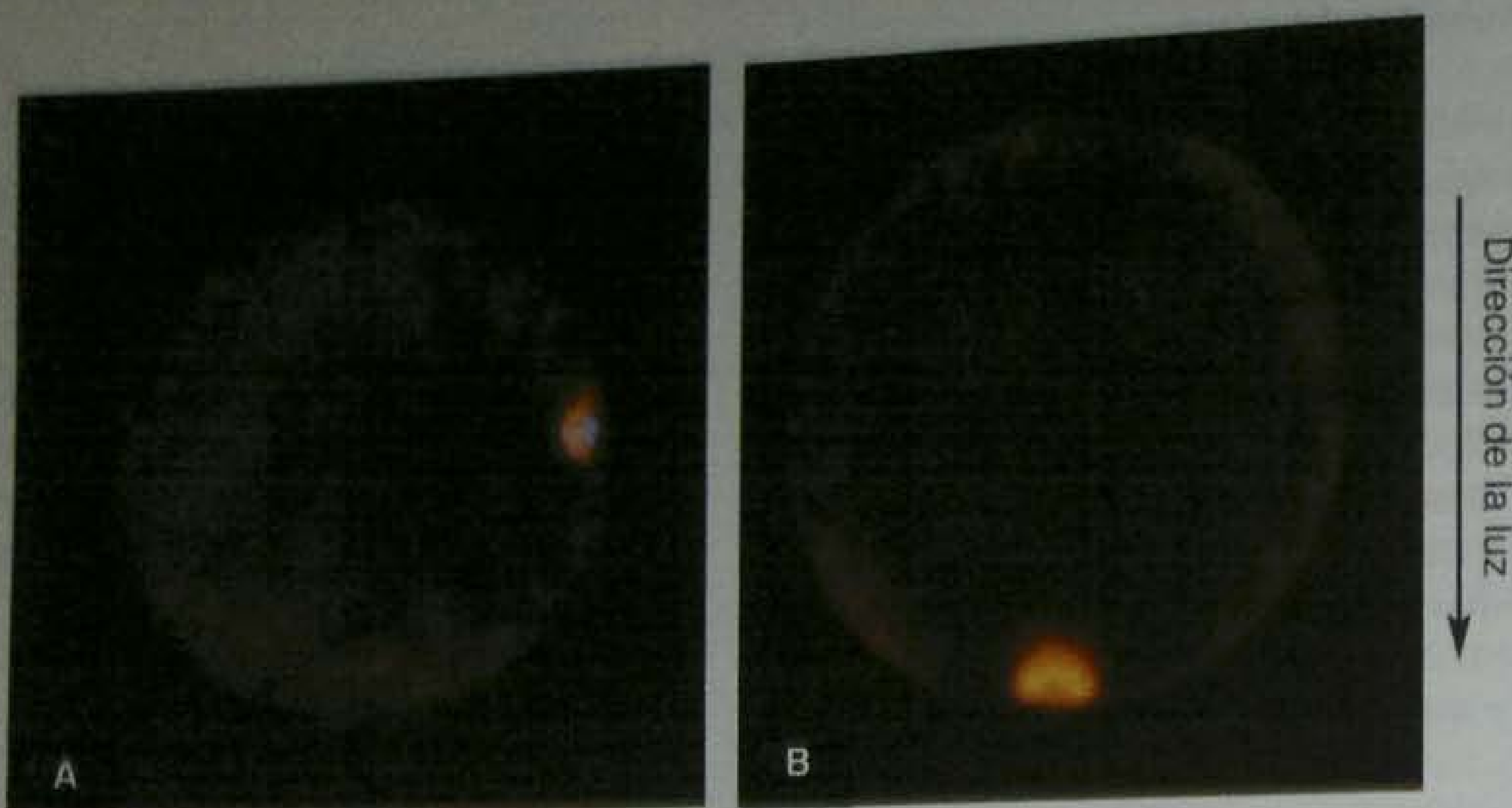


Fig. 20-16. Formación de ejes en el alga parda *Pelvetia compressa*. **A.** En primer lugar se forma un pequeño parche de actina F (naranja) en el punto de entrada del espermatozoide (la mancha azul marca el pronúcleo del espermatozoide). **B.** Posteriormente, la luz estuvo brillando en la dirección de la flecha. El eje inducido por el espermatozoide fue anulado y se formó un parche de actina-F sobre el lado oscuro, donde posteriormente se formará el rizoide. (Microfotografías cortesía de W. Hables.)

lula terminal y a una **célula basal** (fig. 20-18). La célula terminal da origen al **embrión propiamente dicho**. La célula basal se forma próxima al micropilo y da origen al **suspensor**. La **hipófisis** es hallada en la interfase entre el suspensor y el embrión propiamente dicho. En algunas especies ésta da origen a una porción de las células de la raíz. (Las células suspensoras se dividen para formar un órgano filamentoso o esférico que degenera más tarde en la embriogénesis.) En las gimnospermas y en las angiospermas, el suspensor orienta la superficie de absorción del embrión hacia su fuente de alimentos; en las angiospermas, éste también parece servir como un conducto de nutrientes para el embrión en desarrollo. Los embriones de habichuelas verde escarlata (judías o porotos verdes) (*Phaseolus coccineus*) aislados en cultivos con suspensor o sin él han demostrado la necesidad de un suspensor durante el estadio de desarrollo con forma de corazón en los dicotiledóneos (fig. 20-19; Yeung y Sussex 1979). Los embriones cultivados en este estadio con un suspensor tienen dos veces más de probabilidades de sobrevivir que los embriones cultivados sin un suspensor adherido. El suspensor puede ser una fuente de hormonas. En las habichuelas verde escarlata (judías), los embriones más jóvenes sin un suspensor pueden sobrevivir en cultivos si son suplementados con la hormona de crecimiento ácido giberelico (giberelinas) (Cionini y col. 1976).

Como el establecimiento de la polaridad apicobasal es uno de los logros clave de la embriogénesis, es útil considerar cómo el suspensor y el embrión propiamente dicho desarrollan morfologías únicas. Tan temprano como en el estadio de 4 células en el desarrollo de la habichuela verde escarlata, hay distinta transcripción en las células apicales y basales (Weterings y col. 2001). Los genes aislados desde una biblioteca genómica de habichuela verde escarlata han mostrado ser expresados selectivamente en las células del suspensor o del embrión. Cuando estos genes son introducidos en las plantas transgénicas del tabaco, con el uso de hibridación in situ, se observa que el mismo patrón de expresión define al suspensor y al embrión. En *Arabidopsis*, *MERISTEM LAYER 1* (capa

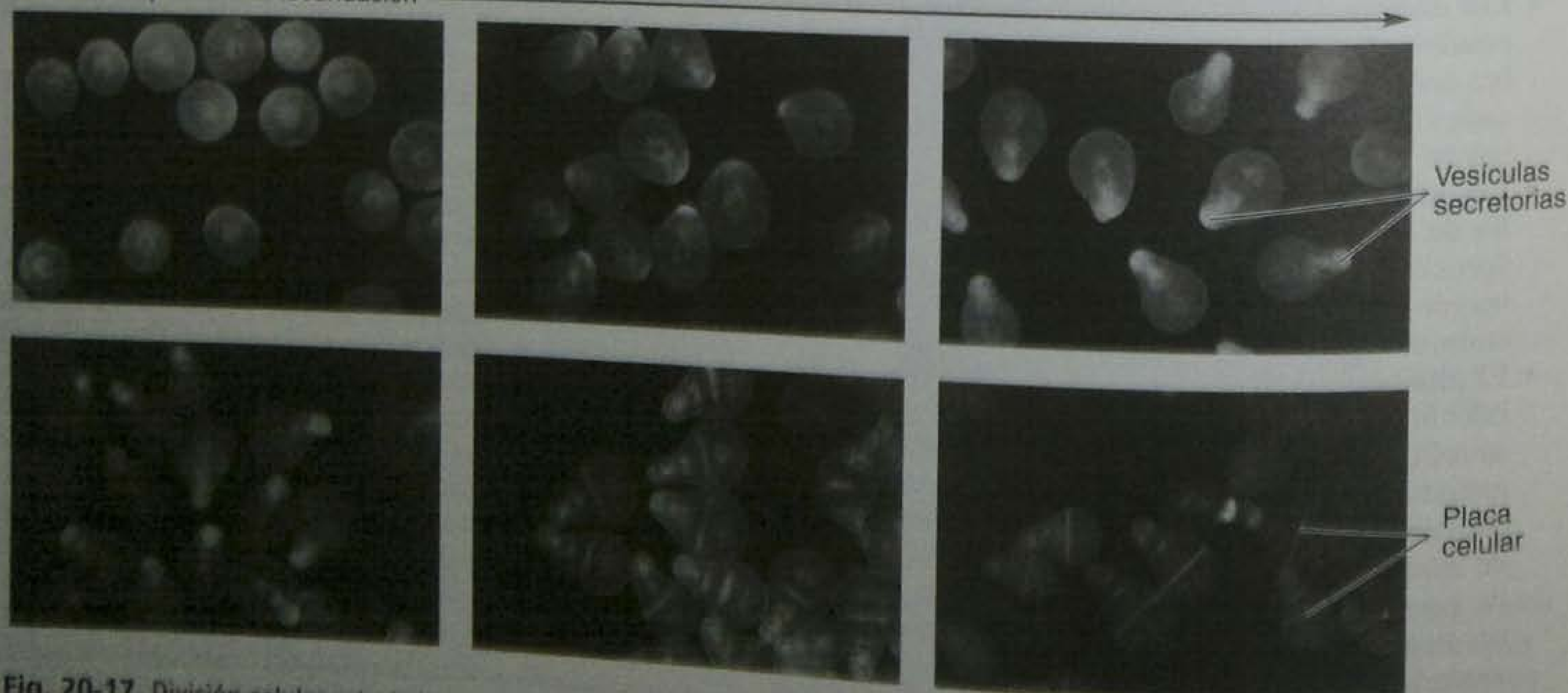


Fig. 20-17. División celular asimétrica en el alga parda. Curso temporal desde 8 a 25 horas después de la fecundación, en el que se muestra las células de las algas teñidas con un colorante vital de membrana para visualizar las vesículas secretorias, que aparecen primero y la placa celular, que comienza a aparecer cerca de la mitad del camino a lo largo de esta secuencia. (Microfotografías cortesía de K. Belanger.)

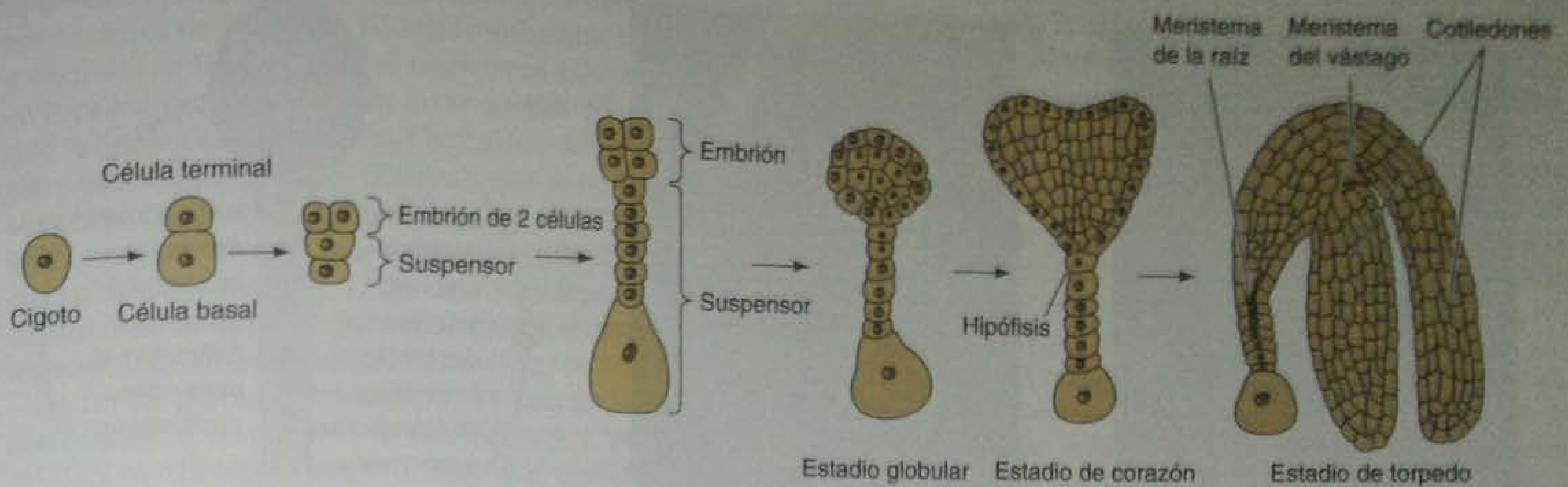


Fig. 20-18. Embriogénesis de angiosperma. Se muestra una dicotiledónea representativa; una monocotiledónea debería desarrollar solo un único cotiledón. Mientras que hay patrones básicos de embriogénesis en angiospermas, hay enormes variaciones morfológicas entre las especies.

meristémica 1) (*AtML1*) se expresa en la célula hija apical, pero no en la célula hija basal en el estadio de dos células (Lu y col. 1996).

El estudio de los embriones mutantes en el maíz y en *Arabidopsis* ha sido particularmente útil en la separación de las diferentes vías de desarrollo de embriones y suspensores. Las investigaciones de suspensores mutantes (*sus1*, *sus2* y *raspberry1*) de *Arabidopsis* han proporcionado evidencia genética de que el suspensor tiene la capacidad para desarrollar estructuras tipo embrionarias (fig. 20-20; Schwartz y col. 1994; Yadegari y col. 1994). En estos mutantes, las anomalías en el embrión propiamente dicho aparecen antes que las anomalías del suspensor.* Los experimentos tempranos en los que el embrión propiamente dicho fue extirpado también demostraron que los suspensores podían desarrollarse como embriones (Haccius 1963). Una señal desde el embrión propiamente dicho hacia el suspensor puede ser importante en el mantenimiento de la identidad del suspensor y en el bloqueo del desarrollo del suspensor como un embrión. Los análisis moleculares de éstos y de otros genes han proporcionado una aproximación hacia los mecanismos de comunicación entre el suspensor y el embrión propiamente dicho.

El gen *SUS1* ha sido renombrado como *DCL1* (*DICER-LIKE1*) debido a que su secuencia de proteína predecida es estructuralmente como la de *Dicer* en *Drosophila melanogaster* y como la de *DCR-1* en *C. elegans* (Schauer y col. 2002). Estas proteínas son parte de una enzima que procesa RNA que puede controlar la traducción de mRNA importantes para el desarrollo. Este apasionante descubrimiento debería llevar a un mejor entendimiento de la regulación del desarrollo más allá del nivel de control transcripcional.

Curiosamente, *DCL1* tiene varios alelos que al principio se asumió que eran genes completamente diferentes que regulan procesos de desarrollo muy diferentes. Los alelos de *DCL1* incluyen a los alelos de *SIN1*. Estos mutantes afectan el desarrollo del óvulo (discutido en el siguiente párrafo) y la transición desde desarrollo vegetativo hacia el reproductivo. El alelo *carpel factory* (*caf-1*) de *DCL1* causa indeterminancia en los meristemas florales, lo que lleva a un verticilo extra de carpelos. Sobre la base de la función de la proteína Dicer de *Drosophila*, *DCL1* puede estar involucrado en segmentar RNA pequeños no codificantes hacia productos de RNA de una sola cadena aún más pequeños, 21-25 nucleótidos, que pueden segmentar mRNA y afectar la traducción. Surgen

	Región cultivada del embrión	Plantas desarrolladas (%)
Estadio de corazón (Suspensor)		42
		88
Estadio de cotiledón temprano		100
		100

Fig. 20-19. Papel del suspensor en la embriogénesis dicotiledónea. Cultivo de embriones de habichuela verde escarlata (poroto verde o judía verde) con sus suspensores y sin ellos, han demostrado que el suspensor es esencial para el estadio de corazón, pero no posteriormente. (Según Yeung y Sussex 1979.)

* Otra enigmática característica de estos mutantes es que la diferenciación celular se produce ante la ausencia de morfogénesis. Por lo tanto, la diferenciación celular y la morfogénesis puede estar desacoplada en las plantas.

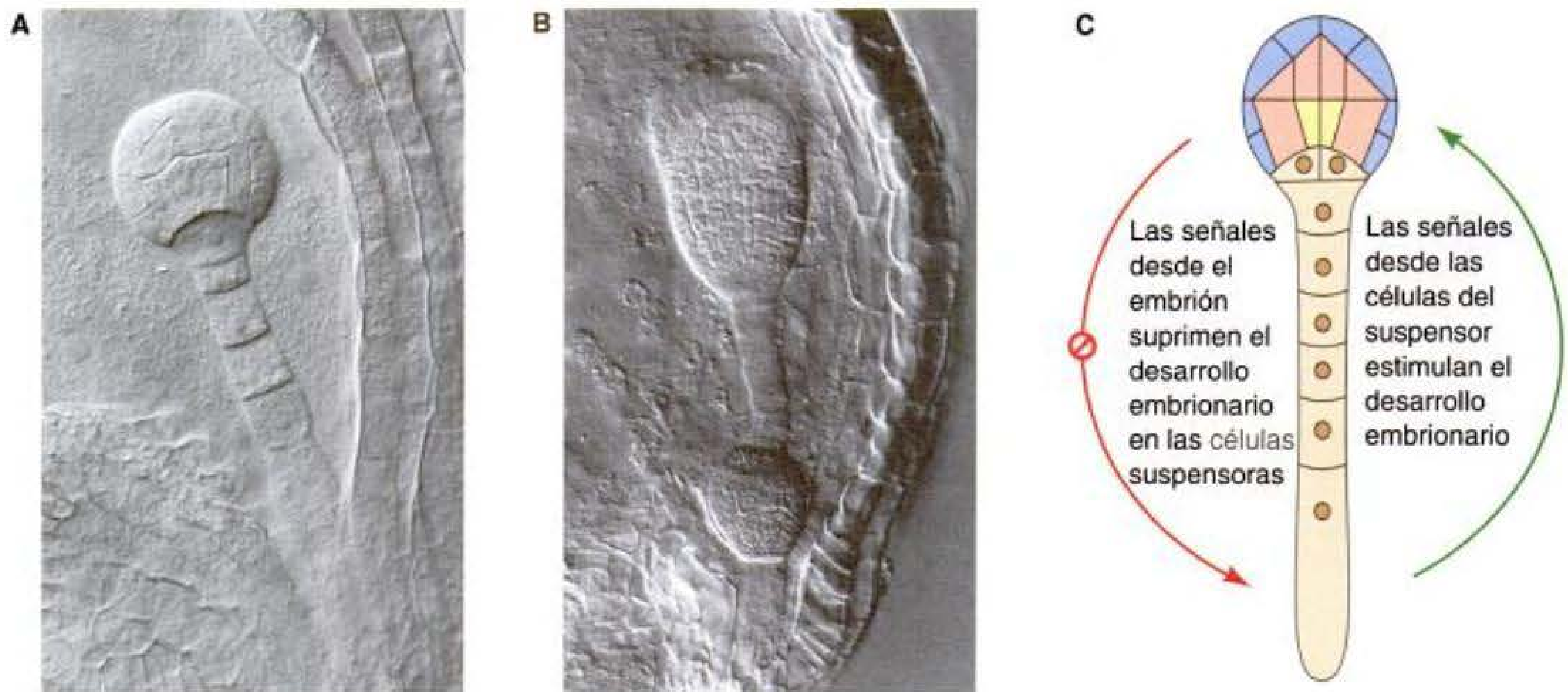


Fig. 20-20. El gen *SUS* (un alelo *DCL1*) suprime el desarrollo embrionario en el suspensor. (A) Embrión y suspensor tipo salvaje. (B) Mutante *sus* con suspensor que se desarrolla como un embrión (flecha). (C) Modelo que muestra cómo el embrión en sí mismo suprime el desarrollo embrionario en el suspensor, y el suspensor proporciona información de retroalimentación hacia el embrión. (Microfotografías cortesía de D. Meinke.)

muchas preguntas sobre el papel de los RNA pequeños como posibles señales de desarrollo del trabajo sobre los alelos *DCL1*.

Los genes efectores maternos juegan un papel clave en el establecimiento del patrón embrionario en animales (véase cap. 9). El papel de los genes extracigóticos en la embriogénesis de plantas es menos claro y el problema es complicado por, al menos, tres fuentes de influencias potenciales: el tejido esporofítico, el tejido gametofítico y el endosperma poliploide. Todos estos tejidos están en estrecha asociación con la ovocélula/cigoto (Ray 1998). El desarrollo del endosperma también puede ser afectado por genes maternos. Los genes efectores maternos esporofíticos y gametofícos han sido identificados en *Arabidopsis*, y es probable que el genoma del endosperma influya también sobre el cigoto. El primer gen efector materno identificado, *SHORT INTEGUMENTS 1* (*SIN1*),

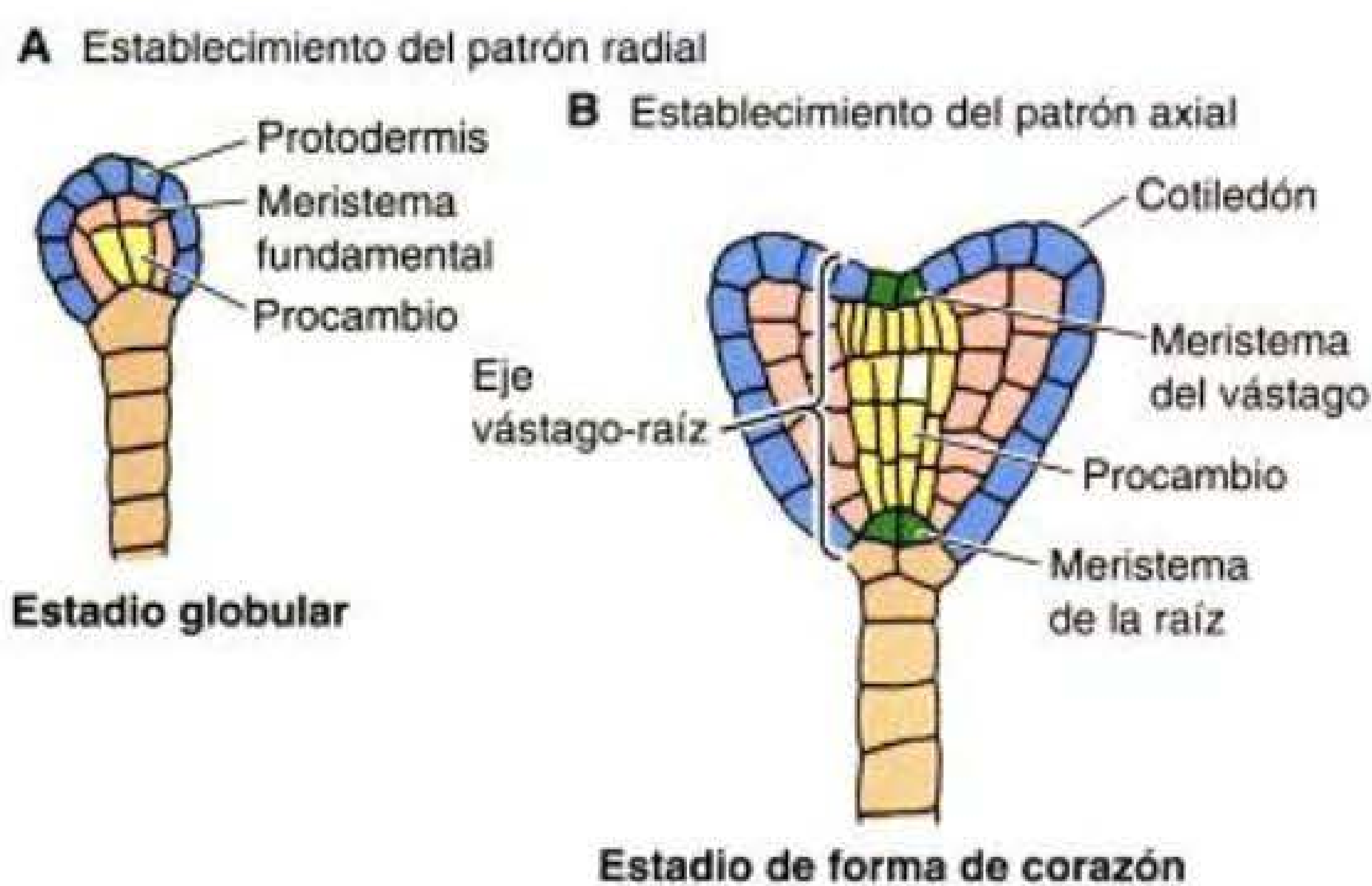


Fig. 20-21. Establecimiento del patrón radial y axial. **A.** El establecimiento del patrón radial en angiospermas comienza en el estadio globular y da como resultado el establecimiento de tres sistemas de tejido. **B.** El patrón axial (eje brote-raíz) es establecido por el estadio de corazón.

debe ser expresado en el esporofito para el desarrollo embrionario normal (Ray y col. 1996). Dos factores de transcripción (FBP7 y FBP11) son necesarios en el esporofito de petunia para el desarrollo normal del endosperma (Columbo y col. 1997). Un gen efector materno gametofítico femenino, *MEDEA* (por la Medea de Eurípides, quien asesinó a sus propios hijos), tiene dominios proteicos similares a los de los genes efectores maternos de *Drosophila* (Grossniklaus y col. 1998). Curiosamente, *MEDEA* está en el grupo génico Polycomb cuyos productos alteran la cromatina (de manera directa o indirecta) y afectan la transcripción. *MEDEA* afecta la impronta génica (véase cap. 5) que es expresada por el gametofito femenino y por alelos maternamente heredados en el cigoto, pero no por alelos paternamente heredados (Vielle-Calzada y col. 1999). Todavía sigue siendo una pregunta sin responder qué tan importantes son los genes efectores maternos en el establecimiento del plan corporal del esporofito.

Los patrones radial y axial se desarrollan a medida que continúa la división y diferenciación celulares (fig. 20-21; véase además Bowman 1994 para microfotografías de luz detalladas de la embriogénesis de *Arabidopsis*). Las células del embrión propiamente dicho se dividen en planos transverso y longitudinal para formar un embrión en **estadio globular** con varios pisos de células. Superficialmente, este estadio posee algunas semejanzas con la segmentación en animales, pero la relación núcleo citoplasma no necesariamente se incrementa. La forma que surge del embrión depende de la regulación de los planos de división celular y de la expansión, debido a que las células no son capaces de moverse y dar una nueva forma al embrión. Los planos de división celular en la capa externa de células se restringen y esta capa, denominada **protodermis**, se diferencia. Surge el establecimiento del patrón radial en el estadio globular cuando se inician los tres sistemas de tejidos (dérmico, fundamental y vascular) de la planta. El **tejido dérmico** (epidermis) se forma-

rá desde la protodermis y contribuye a las capas protectoras externas de la planta. El **tejido fundamental** (corteza y médula) se forma desde el meristema fundamental, que se localiza por debajo de la protodermis. El **procambio**, que se forma en el centro del embrión, dará origen al **tejido vascular** (xilema y floema), que funcionarán en el sostén y transporte. La diferenciación de cada sistema de tejido es, al menos, parcialmente independiente. Por ejemplo, en el mutante *keule* de *Arabidopsis*, el sistema dérmico es defectuoso mientras que el sistema de tejido interno se desarrolla normalmente (Mayer y col. 1991).

La forma globular del embrión se pierde a medida que comienzan a formarse los **cotiledones** ("primeras hojas"). Las dicotiledóneas tienen dos cotiledones, que cuando ellos se forman le dan al embrión una aparente forma de corazón. El plan corporal axial es evidente por este **estadio** del desarrollo de forma **de corazón**. Las hormonas (específicamente, auxinas) pueden mediar la transición de simetría radial a bilateral (Liu y col. 1993). En las monocotiledóneas, como el maíz, solo surge un único cotiledón.

En muchas plantas, los cotiledones ayudan en la nutrición de la planta al hacerse fotosintéticos después de la germinación (aunque los de algunas especies nunca salen de la tierra). En algunos casos –por ejemplo, en las arvejas (guisantes)– la reserva de alimento en el endosperma es consumida antes de la germinación y los cotiledones sirven como una fuente de nutrientes para las plántulas que están germinando.* Aun ante la presencia de un endosperma persistente (como en el maíz), los cotiledones almacenan reservas de alimento tales como almidón, lípidos y proteínas. En muchas monocotiledóneas, el cotiledón crece hacia un órgano de gran tamaño apretado contra el endosperma y ayuda en la transferencia de nutrientes hacia las plántulas. Los cotiledones erguidos pueden dar al embrión una forma de torpedo. En algunas plantas, los cotiledones crecen de modo tal que deben curvarse para colocarse dentro de los límites de la cubierta protectora de la semilla. Luego, el embrión se parece a un bastón. En este momento, el suspensor se está degenerando.

El gen *LEAFY COTYLEDON 1* de *Arabidopsis* fue el primero en ser identificado por un mutante con cotiledones tipo hoja (Meinke 1994). *LEC1* es necesario para mantener al suspensor en el desarrollo temprano, para especificar la identidad del cotiledón, para iniciar la maduración y para impedir la germinación temprana de la semilla. Éste pertenece a los genes de la clase *LEAFY COTYLEDON 1-LIKE* (cotiledón foliáceo tipo 1), que es el único entre los genes de la embriogénesis en actuar a través del curso del desarrollo del embrión (Harada 2001; Kwong y col. 2003).

El **meristema apical del vástago** y el **meristema apical de la raíz** son grupos de células madre que persistirán en la planta posembrionaria y darán origen a la mayor parte del cuerpo del esporofito (véase Jurgens 2001 para una revisión de la formación del patrón apicobasal).

El meristema de la raíz en algunas especies deriva parcialmente de la hipófisis. Todas las otras partes del cuerpo del esporofito derivan del embrión propiamente dicho. La evidencia genética indica que la formación de los meristemas del vástago y de raíz están reguladas de manera independiente. Desde una perspectiva evolutiva, esto no es sorprendente. Una de las principales adaptaciones a la vida terrestre involucró la evolución de un sistema de raíz (las plantas no vasculares, incluyendo los musgos, no desarrollan sistema de raíz). Esta independencia es demostrada por el mutante de maíz *dek23* y el mutante de *Arabidopsis shootmeristemless* (*STM*), los cuales forman un meristema de la raíz pero fracasan en iniciar un meristema del vástago (Clark y Sheridan 1986; Barton y Poethig 1993). El gen *STM*, que tiene un homeodominio, se expresa en el estadio globular tardío, en células que formarán el meristema del vástago. También han sido identificados los genes que afectan específicamente el desarrollo del eje de la raíz durante la embriogénesis. Las mutaciones del gen *HOBBIT* en *Arabidopsis* (Willemson y col. 1998), por ejemplo, afectan a los derivados de la hipófisis y eliminan la función del meristema de la raíz.

Mientras resulta evidente que los programas de desarrollo de la raíz y del vástago son diferentes, lo que desencadena el desarrollo de la raíz o del vástago es menos manejable. El gen *TOPLESS* en *Arabidopsis* puede proporcionar algunas claves. Se ha identificado un solo alelo mutante que convierte un vástago en una raíz, pero todavía es un enigma cómo funcionan los genes tipo salvaje (Long y col. 2002).

El meristema apical del vástago dará comienzo a las hojas después de la germinación y en última instancia a la transición hacia el desarrollo reproductivo. En *Arabidopsis*, los cotiledones son producidos desde el tejido embrionario general, no desde el meristema del vástago (Barton y Poethig 1993). En muchas angiospermas, durante la embriogénesis se inician unas pocas hojas. En el caso de *Arabidopsis*, el análisis clonal señala hacia la presencia de hojas en el embrión maduro, aun cuando ellas no están morfológicamente bien desarrolladas (Irish y Sussex 1992). El análisis clonal ha demostrado que los cotiledones y las primeras dos hojas verdaderas del algodón son derivados del tejido embrionario en lugar de un meristema organizado (Christianson 1986).

Los experimentos de análisis clonal proporcionan información sobre los destinos celulares, pero no indican necesariamente si las células están determinadas o no lo están para un destino particular. Las células, los tejidos y los órganos muestran estar determinados cuando tienen el mismo destino in situ, en aislamiento y en una nueva posición en el organismo (véase McDaniel y col. 1992 para más información sobre los estados de desarrollo en las plantas). Los análisis clonales han demostrado que las células que se dividen en el plano incorrecto y se "mueven" hacia una capa diferente de tejido a menudo se diferencian de acuerdo con su nueva posición. La posición, en lugar del origen clonal, parece ser el factor crítico en la formación del patrón del embrión, lo que sugiere algún tipo de comunicación célula-célula (Laux y Jurgens 1994). Los experimentos de microcirugía sobre el componente somático de embriones de zanahoria demuestran que piezas aisladas del embrión pueden reemplazar con frecuencia el complemento de las partes perdidas (Schiavone y Racusen 1990; Scheres y Heidstra 1999). Un co-

* Las famosas semillas arrugadas mutantes de Mendel (la *rugosus* o alelo *r*) tienen un defecto en la enzima que ramifica el almidón que afecta la biosíntesis de almidón, lípido y proteína en la semilla, y lleva a cotiledones defectuosos (Bhattacharyya y col. 1990).

tiledón extirpado desde el vértice del vástago será reemplazado. Vástagos embrionarios aislados pueden regenerar una nueva raíz; tejidos de raíz aislada regeneran cotiledones, pero es menos probable que regeneren el eje del vástago. Aunque la mayoría de las células embrionarias es pluripotente y puede generar órganos tales como cotiledones y hojas, solo los meristemas conservan esta capacidad en el cuerpo de la planta posembrionaria.

Latencia

Desde los estadios tempranos de la embriogénesis, hay un elevado nivel de expresión de genes cigóticos. A medida que el embrión alcanza la madurez, hay un cambio desde la construcción de un plan corporal básico hacia la creación de una reserva de alimentos mediante la acumulación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos almacenados. Los genes que codifican para las proteínas almacenadas en la semilla estuvieron entre los primeros caracterizados por los biólogos moleculares de plantas, debido a los elevados niveles de mRNA de proteína específica almacenada que está presente en diferentes momentos del desarrollo embrionario. El nivel de actividad metabólica alto en el embrión en desarrollo es abastecido por un ingreso constante desde la planta progenitora



Fig. 20-22. El mutante de maíz *viviparous*. Cada grano sobre esta espiga de maíz contiene un embrión. Estos embriones no atraviesan una fase de latencia, sino que comienzan a germinar mientras todavía están en la espiga. (De McCarty y col. 1989; fotografía © American Society of Plan Biologists, impresa con autorización.)

hacia el óvulo. Finalmente, el metabolismo se hace más lento, y se corta la conexión de la semilla hacia el ovario por la degeneración de las células esporofíticas de sostén adyacentes. La semilla se seca (pierde agua), y los tegumentos se endurecen para formar una cubierta protectora de la semilla resistente. La semilla ha entrado en **latencia**, terminando oficialmente la embriogénesis. El embrión puede persistir en un estado latente por semanas o años, un hecho que ofrece un enorme valor de supervivencia. ¡Ha habido incluso ejemplos de semillas halladas almacenadas en antiguos sitios arqueológicos que germinaron después de miles de años de latencia!

La maduración que lleva a la latencia es el resultado de un programa regulado con precisión. Por ejemplo, la mutación *viviparous* en maíz produce lesiones genéticas que bloquean la latencia (fig. 20-22; Steeves y Sussex 1989). Los meristemas apicales de los mutantes *viviparous* se comportan como los de los helechos, sin pausa antes de la producción de estructuras posembrionarias. El embrión continúa desarrollándose, y surgen plántulas desde los granos sobre las espigas adheridas a la planta progenitora. Recientemente, se ha identificado a un grupo de genes de planta que pertenecen al grupo Polycomb, que regula el desarrollo temprano en mamíferos, nematodos e insectos (Preuss 1999). Estos genes codifican factores que silencian la cromatina, que pueden jugar un papel importante en la formación de la semilla.

Las hormonas de las plantas son críticas en la latencia y su relación con los mecanismos genéticos es un área de investigación muy activa. La hormona **ácido abscísico** es importante en el mantenimiento de la latencia en muchas especies. Las **giberelinas**, otra clase de hormonas, son importantes en la ruptura de la latencia.

Germinación

La fase posembrionaria del desarrollo de la planta comienza con la **germinación**. Algunas semillas latentes requieren de un período de **maduración posterior** durante el cual bajos niveles de actividad metabólica continúan preparando al embrión para la germinación. Las interacciones más evolucionadas entre la semilla y su ambiente incrementan las probabilidades para que las plántulas que están germinando sobrevivan para producir otra generación. La temperatura, el agua, la luz y el oxígeno son claves en la determinación del éxito de la germinación. La **estratificación** es el requerimiento para que el enfriamiento (5°C) rompa la dormición en algunas semillas. En climas templados, esta adaptación asegura la germinación solamente después de haber pasado los meses de invierno. Además, muchas semillas tienen el máximo grado de germinación a temperaturas moderadas de 25°C-30°C y a menudo no germinarán en temperaturas extremas. Las semillas tales como las de la lechuga requieren luz (específicamente, la de longitud de onda roja) para la geminación; estas semillas no germinarán mucho debajo de la tierra debido a que consumen sus reservas de alimento antes de que sea posible la fotosíntesis.

Las semillas desecadas pueden tener solo un 5-20% de agua. La **imbibición** es el proceso por el cual la semilla se rehidrata, absorbiendo grandes volúmenes de agua y aumentando muchas veces su tamaño original. La **radícula** (raíz embrionaria primaria) surge desde la semilla en primer lugar para potenciar la incorporación de agua;

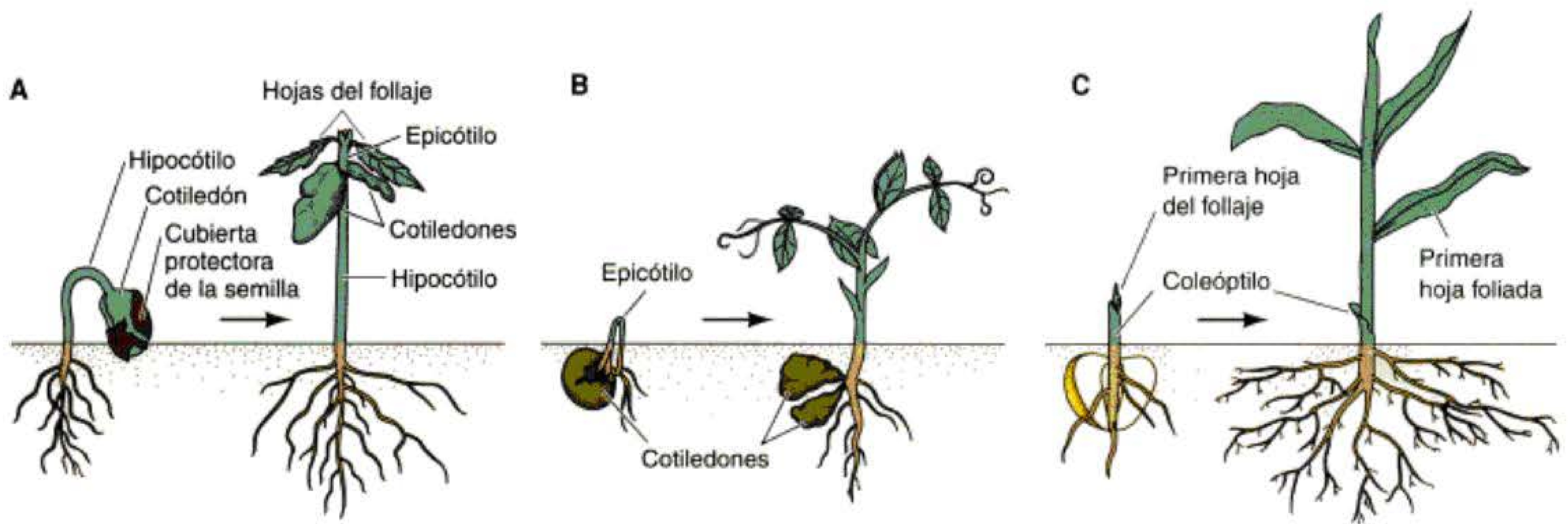


Fig. 20-23. Los meristemas tienen células muy delicadas que son susceptibles a dañarse durante la germinación. Una variedad de estrategias ha evolucionado para proteger al meristema del vástago durante la germinación. **A.** Algunos cotiledones protegen al meristema a medida que el vástago surge desde la tierra. **B.** El epicótilo curvado (y a veces los hipocótilos) empuja a través de la tierra. **C.** Las monocotiledóneas utilizan el coleóptilo, una estructura tipo hoja que envaina al joven extremo del vástago.

está protegida por un casquete (caliptra) de la raíz producida por el meristema apical de la raíz. El agua es esencial para la actividad metabólica, pero también lo es el oxígeno. Una semilla colocada en un vaso de agua no sobrevivirá. Algunas especies tienen cubiertas protectoras de la semilla tan resistentes que deben ser **escarificadas** (picadas o grabadas) antes que el agua o el oxígeno puedan cruzar la barrera. La escarificación puede producirse porque la semilla está siendo expuesta al clima y a otros elementos naturales durante mucho tiempo o por su exposición a ácidos cuando la semilla pasa a través del intestino de un frugívoro (animal que consume fruta). Por lo tanto, el frugívoro prepara la semilla para la germinación, así como la dispersión de ésta hacia un sitio donde la germinación puede tener lugar.

Durante la germinación, las plantas extraen las reservas de nutrientes del endosperma o de los cotiledones. Las interacciones entre el embrión y el endosperma en las monocotiledóneas utilizan giberelina como una señal que desencadena la ruptura del almidón hacia azúcar. Cuando el vástago alcanza la superficie, la diferenciación de los cloroplastos se desencadena por la luz. Las plántulas que germinan en la oscuridad tienen tallos largos, altos y débiles, y no producen clorofila. Esta respuesta ambiental les permite a las plantas utilizar sus recursos limitados para alcanzar la superficie de la tierra, donde la fotosíntesis será productiva.

El delicado extremo del vástago debe ser protegido cuando éste empuja a través de la tierra. Han evolucionado tres estrategias para la protección del extremo del vástago (fig. 20-23):

1. Los cotiledones protegen el extremo del vástago.
2. El epicótilo (el tallo por arriba de los cotiledones) se curva de modo tal que el tejido del tallo, en lugar del extremo del vástago, empuja a través de la tierra.
3. En las monocotiledóneas, una estructura especial tipo hoja, el coleóptilo, forma una vaina de protección alrededor del extremo del vástago.

Crecimiento vegetativo

Cuando el vástago surge desde la tierra, la mayor parte del plan corporal del esporofito tiene que ser elaborado. La figura 20-24 muestra las partes básicas del esporofito maduro de la planta, que surgirá de los meristemas.

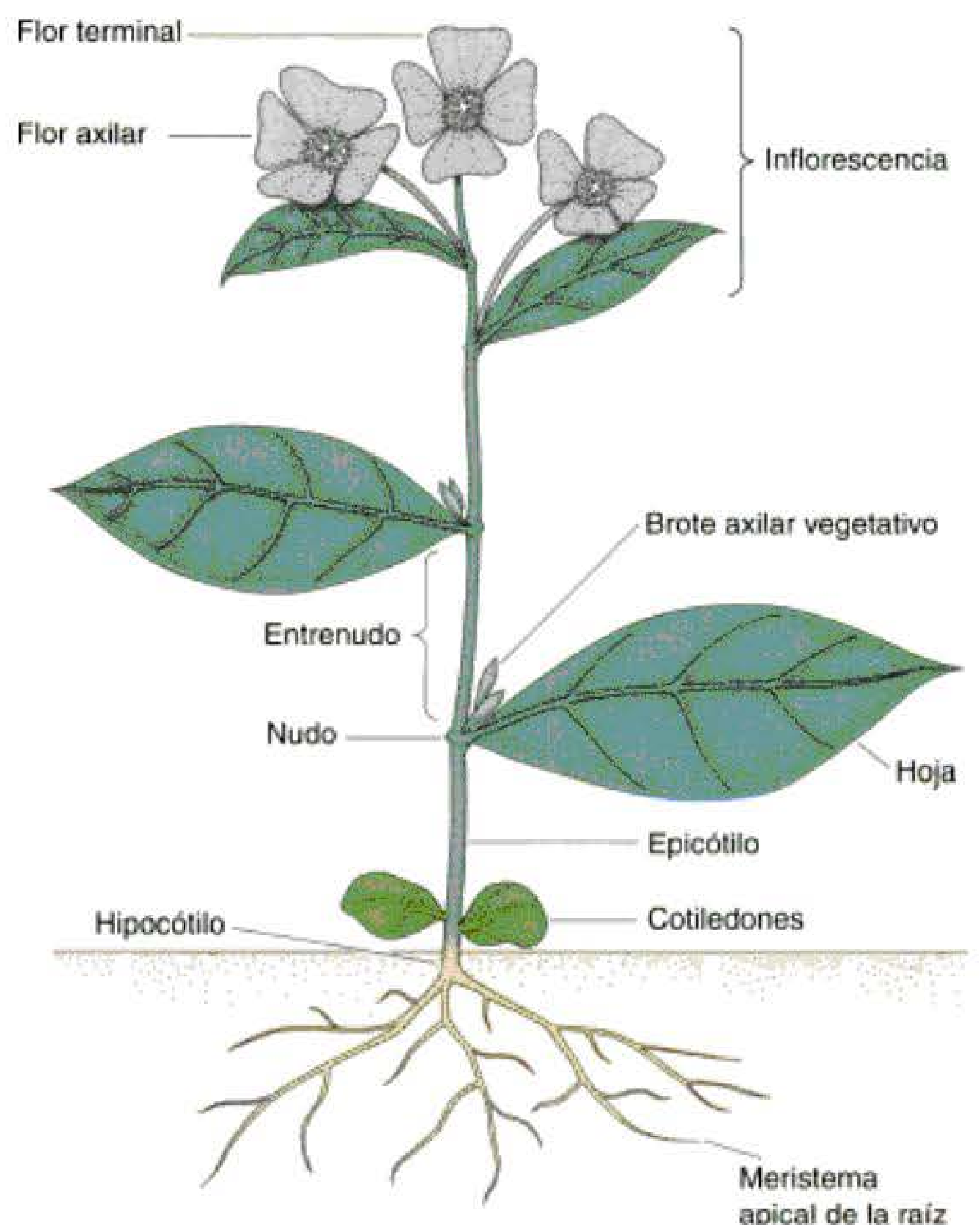


Fig. 20-24. Morfología generalizada de un esporofito de angiosperma.

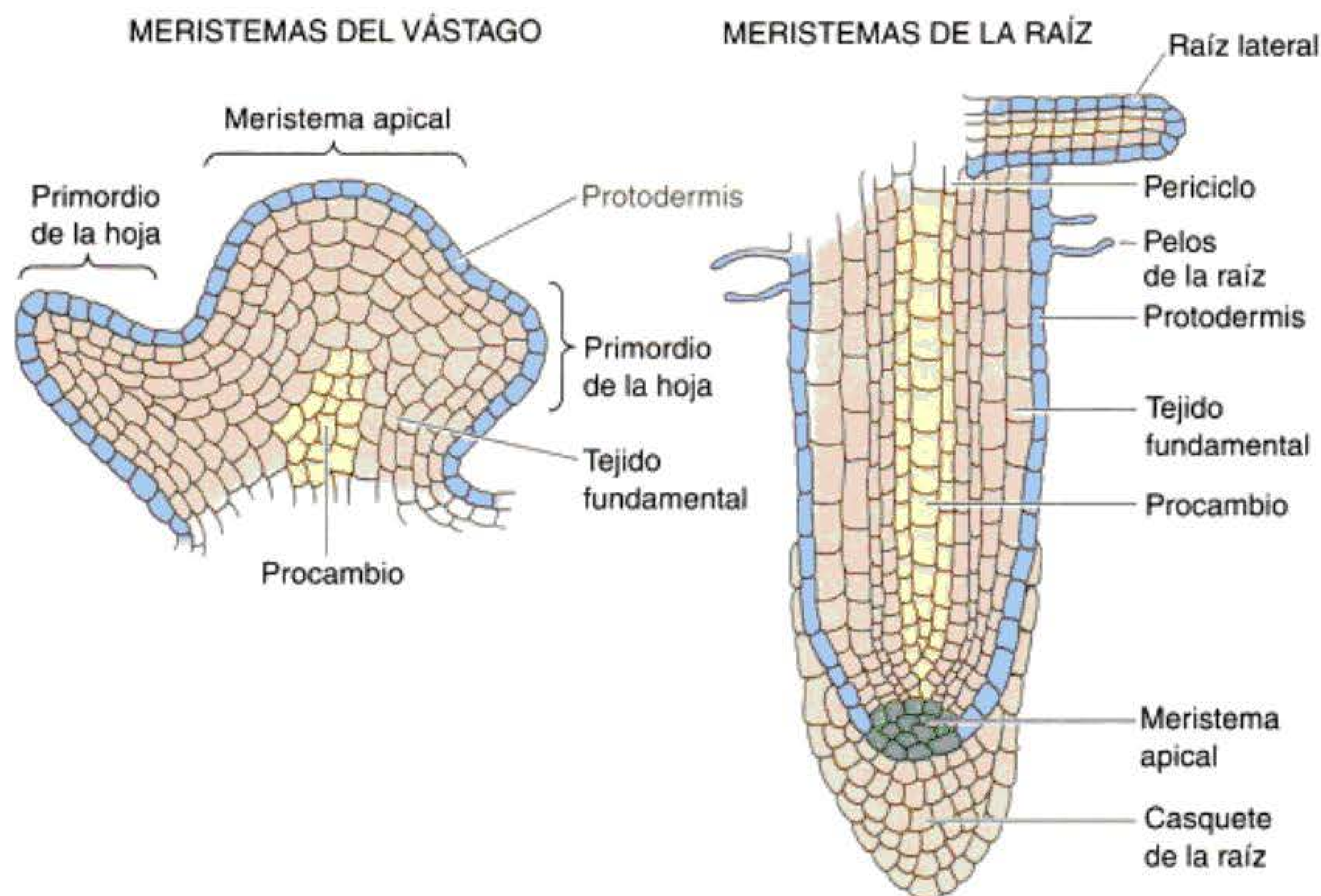


Fig. 20-25. Meristemas apicales del vástago y de la raíz. Los vástagos y las raíces se desarrollan desde células indiferenciadas de los meristemas apicales agrupadas en sus extremos. En las raíces, también se produce un casquete de la raíz, que protege al meristema a medida que éste crece a través de la tierra. Los órganos laterales del vástago (hojas y ramificaciones axilares) tienen un origen superficial en los meristemas apicales del vástago. Las raíces laterales derivan de las células profundas del periciclo dentro de la raíz.

Meristemas

Como se ha mencionado, los meristemas son grupos de células que permiten que el patrón corporal básico establecido durante la embriogénesis sea reiterado y ampliado después de la germinación. Las células meristemáticas son similares a las células madre en animales.* Ellas se dividen para dar origen a una célula hija que continúa siendo meristemática y otra que se diferencia. Los meristemas caen en tres categorías: apical, lateral e intercalar.

Los **meristemas apicales** se producen en los extremos en crecimiento del vástago y de la raíz (fig. 20-25). Los meristemas apicales de la raíz producen el casquete de la raíz, que consiste en células lubricadas que son liberadas a medida que el meristema es empujado a través de la tierra por la división celular y el alargamiento en las células más proximales. El meristema apical de la raíz también da origen a células hijas que producen los tres sistemas de tejido de la raíz. Los nuevos meristemas apicales de la raíz son iniciados desde el tejido dentro de la médula de la raíz y emergen a través del tejido fundamental y del tejido dérmico. Los meristemas de la raíz también pueden derivar secundariamente del tallo de la planta; en el caso del maíz, ésta es la principal fuente de raíces.

El meristema apical del vástago produce tallos, hojas y estructuras reproductoras. Además del meristema apical del vástago iniciado durante la embriogénesis, en las axilas (los ángulos entre la hoja y el tallo) se forman meristemas apicales axilares (brotes o yemas axilares; véase fig. 20-24) derivados del original. A diferencia de los nuevos meristemas de la raíz, éstos se originan desde las capas superficiales del meristema.

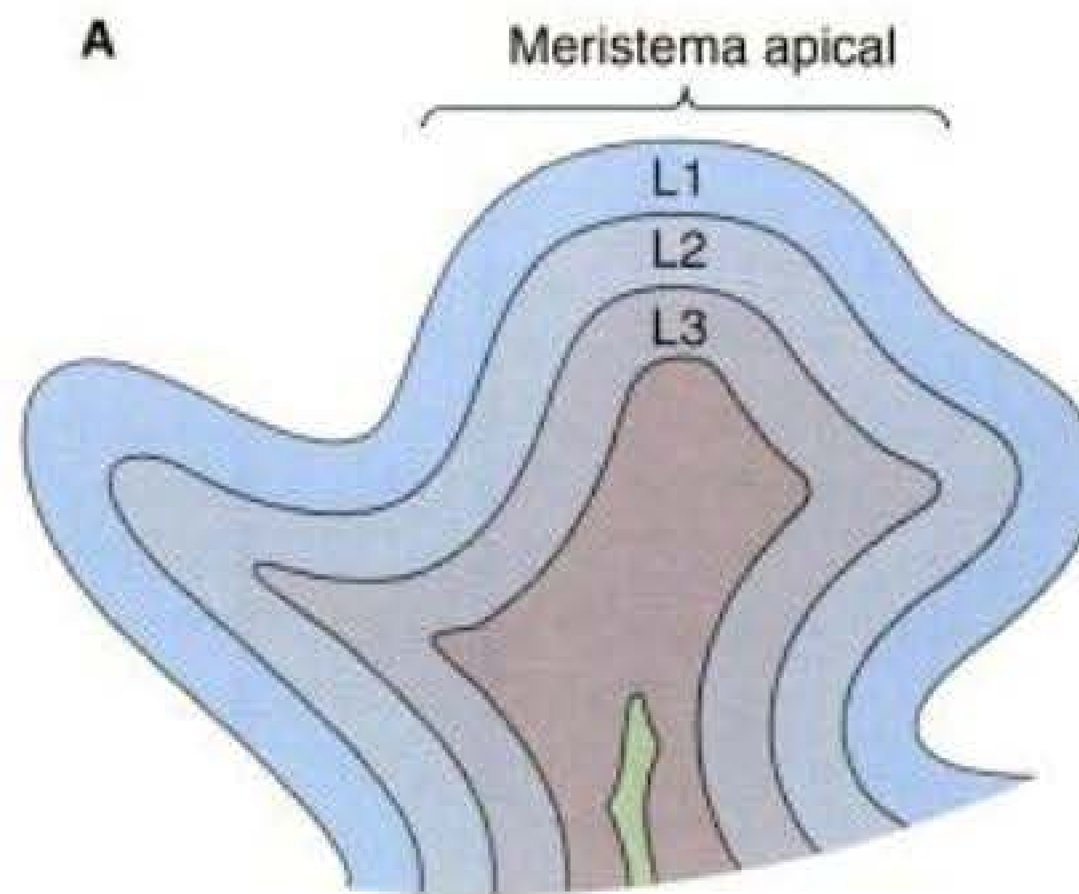
Los meristemas apicales de angiosperma están compuestos de hasta tres capas de células (marcadas L1, L2 y L3) sobre la superficie de la planta (fig. 20-26). Un camino para investigar las contribuciones de las diferentes capas a la estructura de la planta es mediante la construcción de quimeras. Las plantas quiméricas están compuestas de capas que tienen distintos fenotipos con marcadores distinguibles. Por ejemplo, cuando L2 tiene un genotipo diferente que el de L1 o el de L3, todo el polen tendrá el genotipo L2, indicando que el polen es derivado de L2. Las quimeras también han sido utilizadas para demostrar inducción clásica en plantas, en la que, como en el desarrollo animal, una capa tiene capacidad para influir sobre la vía de desarrollo de una capa adyacente.

El tamaño del meristema apical del vástago es controlado precisamente por las señales intercelulares, más probablemente entre las capas del meristema (revisión por Doerner 1999). Por ejemplo, las mutaciones en los genes *CLAVATA* (*CLV*) de *Arabidopsis* llevan a un aumento del tamaño del meristema y a la producción de órganos adicionales. *CLV1*, *CLV2* y *CLV3* limitan el número de células madre indiferenciadas en los meristemas vegetativo y floral. La proteína CLV1 es una cinasa serino/treonina que, junto con la proteína receptora CLV2 tipo transmembrana, forma un receptor para la proteína CLV3, que está localizada en el espacio extracelular entre las capas celulares del meristema (fig. 20-27; Clark y col. 1997; Jeong y col. 1999; Rojo y col. 2002). *POLSTERGEIST* (*POL*) y *WUSCHEL* (*WUS*) son redundantes en la función y parecen mantener a los genes en un estado indiferenciado (Yu y col. 2000). Es posible que la expresión de *POL* sea un blanco en la transducción de la señal de CLV1. *STM*, como *POL* y *WUS*, juegan un papel importante en el mantenimiento de una población indiferenciada de células meristemáticas y *STM* puede regular positivamente a *WUS* (Clark y Schiefelbein 1997). Las interacciones de estos productos génicos mantienen el equili-

* Las semejanzas entre las células del meristema de las plantas y las células madre animales pueden extenderse a nivel molecular, lo que indica que las células madre existen antes que las plantas y los animales continuaran por caminos filogenéticos separados. Se ha encontrado homología entre los genes requerida para que los meristemas de las plantas persistan y los genes expresados en las células madre de la línea germinal de *Drosophila* (Cox y col. 1998).

brio entre la proporción de la división celular (que aumenta el tamaño del meristema) y la proporción de la diferenciación celular en la periferia del meristema (que disminuye el tamaño del meristema) (Meyerowitz 1997).

Los **meristemas laterales** son meristemas cilíndricos hallados en los vástagos y en las raíces que resultan en crecimiento secundario (un incremento en la circunferencia del tallo y de la raíz por la producción de tejidos vasculares). Los tallos monocotiledóneos no tienen meristemas laterales, pero a menudo tienen **meristemas intercalares** insertados en los tallos entre los tejidos maduros. Los ligeros estallidos que se pueden oír en un maizal en una noche de verano son causados en realidad por el rápido aumento en la longitud del tallo debido a los meristemas intercalares.



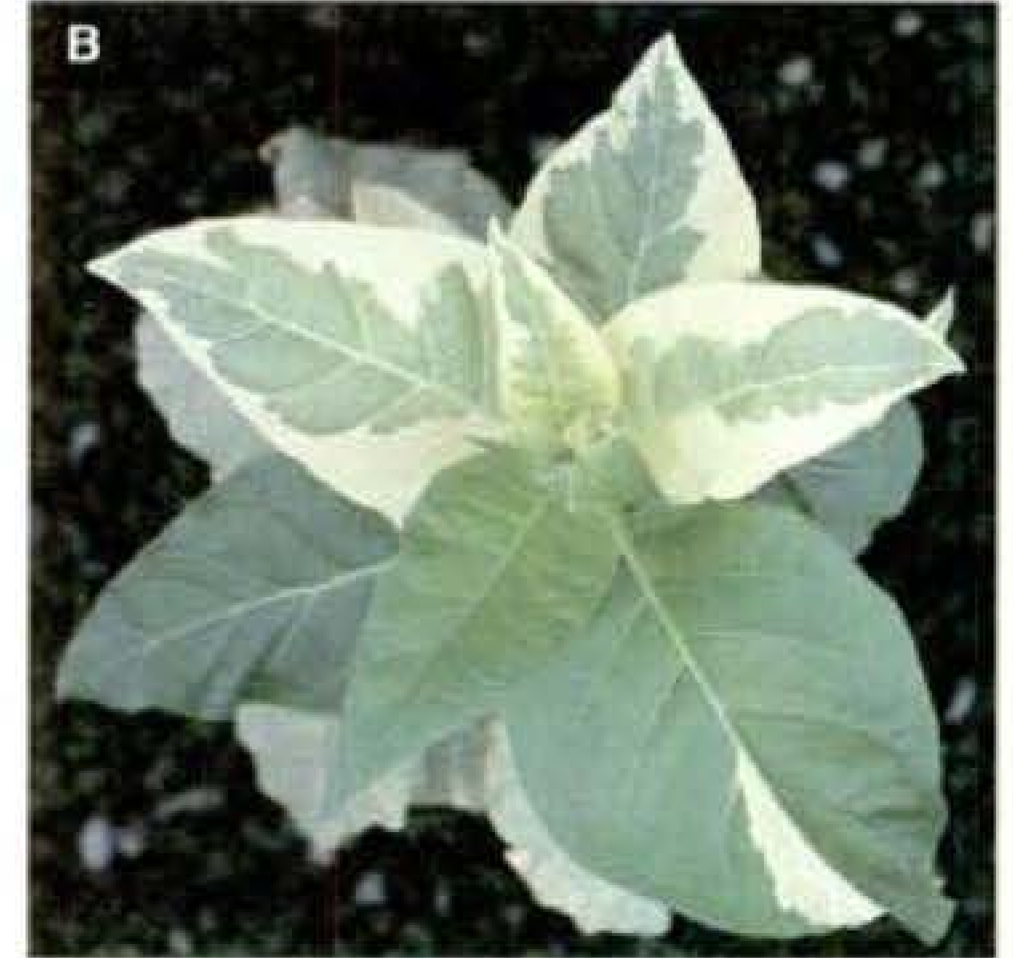


Fig. 20-26. Organización del meristema apical del vástago. **A.** Los meristemas de las angiospermas tienen dos o tres capas externas de células que son histológicamente distintas (aquí marcadas L1, L2 y L3). Mientras que las células en ciertas capas tienden a tener ciertos destinos, no están necesariamente comprometidas a aquellos destinos. Si una célula es cambiada a una nueva capa, ésta generalmente se desarrolla como las otras células en aquella capa. **B.** Se pueden ver los destinos de las capas celulares en una planta quimérica del tabaco. Una porción del meristema contiene tres capas de células tipo salvaje, mientras que otra porción tiene una L2 que carece de clorofila. Esta sección del meristema ha dado origen a hojas multicolores. En las plantas tipo salvaje, la capa L1 siempre carece de clorofila (excepto en las células de guarda), pero en esta planta la L2, también es genéticamente incapaz de producir clorofila; la L3 se mantiene verde. La L3 no contribuye a los bordes externos de las hojas, que es por lo que aparecen blancas en esta planta. (Fotografía cortesía de M. Marcotrigiano.)

Desarrollo de la raíz

El establecimiento del patrón radial y axial en la raíz comienza durante la embriogénesis y continúa durante el desarrollo a medida que crece la raíz primaria y que las raíces laterales surgen desde las profundas células del periciclo dentro de la raíz. Los análisis clonales y los experimentos de ablación por láser que eliminan células individuales han demostrado que las células de la raíz son plásticas y que la posición es el determinante primario del destino en el desarrollo temprano de la raíz. Los análisis de la organización radial de la raíz en los mutantes han revelado genes con actividad específica de capa (Scheres y col. 1995; Scheres y Heidstra 1999). Se ilustrará este hallazgo mediante el análisis de dos genes de *Arabidopsis* que regulan el destino del tejido fundamental.

La *Arabidopsis* tipo salvaje tiene dos capas de tejido fundamental de la raíz. La capa más externa se convierte en la corteza; la capa más interna llega a ser endodermo, que forma un tubo alrededor del tejido vascular central. Los genes *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORT-ROOT* (*SHR*) tienen fenotipos mutantes con una capa de tejido fundamental de la raíz, en lugar de dos (Benfey y col. 1993). El gen *SCR* es necesario para una división celular asimétrica en las células de la capa inicial, que da lugar a una célula endodérmica más pequeña y una célula de la corteza más grande (fig. 20-28). El mutante *scr* expresa marcadores para las células de la corteza y para las endodérmicas, indicando que la diferenciación progresa ante la ausencia de la división celular (Di Laurenzio y col. 1996). *SHR* es responsable de la especificación de las células endodérmicas. Las células en los mutantes *shr* no desarrollan características endodérmicas.

El establecimiento del patrón axial en las raíces puede ser dependiente de morfógeno, en paralelo con algunos aspectos del desarrollo animal. Una variedad de experimentos ha establecido que la distribución de la hormona auxina de las plantas organiza el patrón axial. Un pico en la concentración de auxina en el extremo de la raíz debe ser percibido para el establecimiento del patrón axial normal (Sabatini y col. 1999).

Como ya se explicó, se han identificado distintos genes que especifican la formación del meristema de la raíz y del vástago; sin embargo, el desarrollo del vástago y de la raíz puede compartir grupos comunes de genes que regulan el destino celular y el establecimiento del patrón

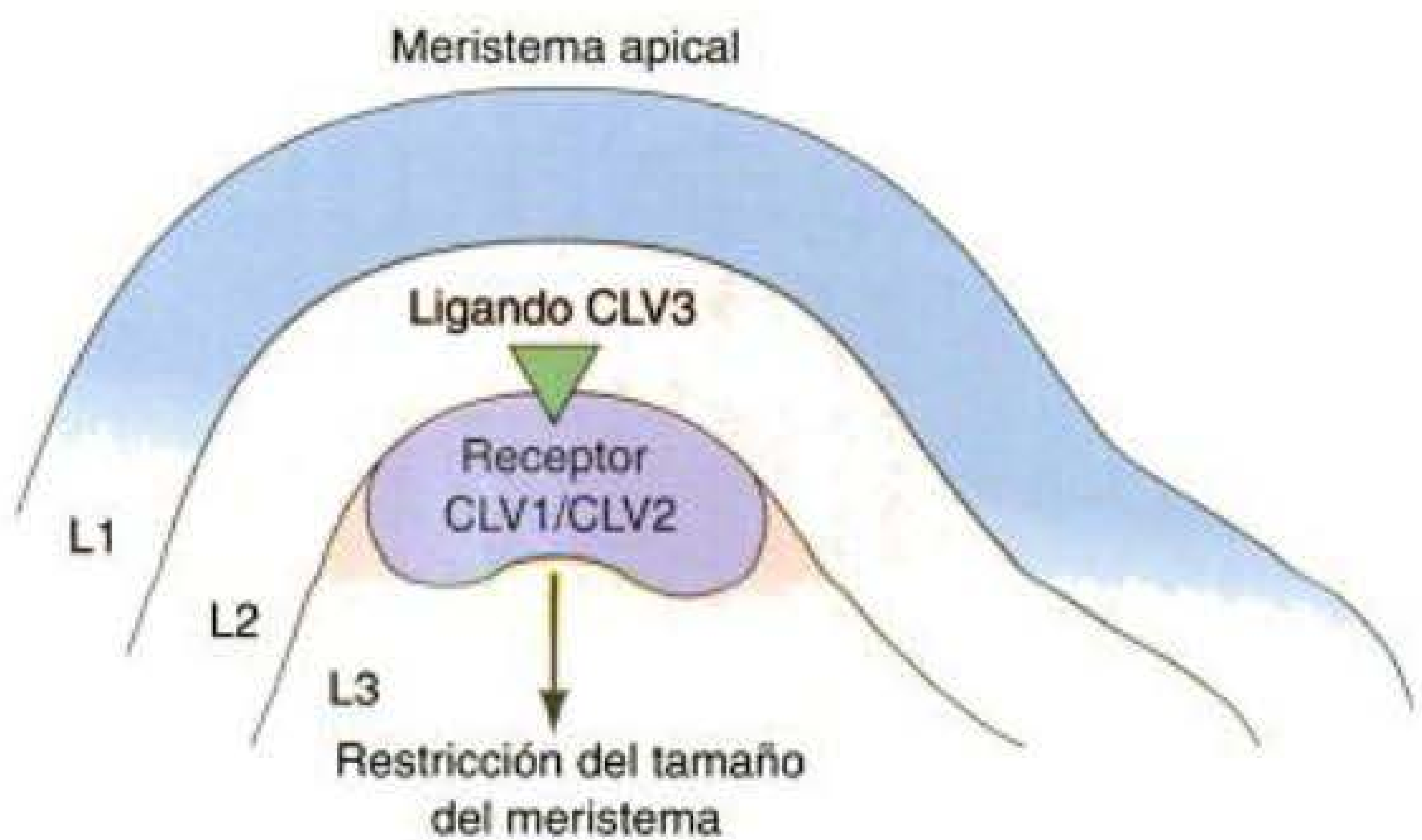


Fig. 20-27. Los genes *CLAVATA* son necesarios para limitar el fondo común de células meristémicas indiferenciadas. La proteína CLV3 se expresa en L1 y L2. Ésta se desplaza localmente para unirse al receptor CLV1/CLV2 en las células L3. Esa unión desencadena una cascada de transducción de una señal que regula el número de células indiferenciadas en el meristema y equilibra los papeles de *STM* y *WUS* en el mantenimiento de las células indiferenciadas y en división.

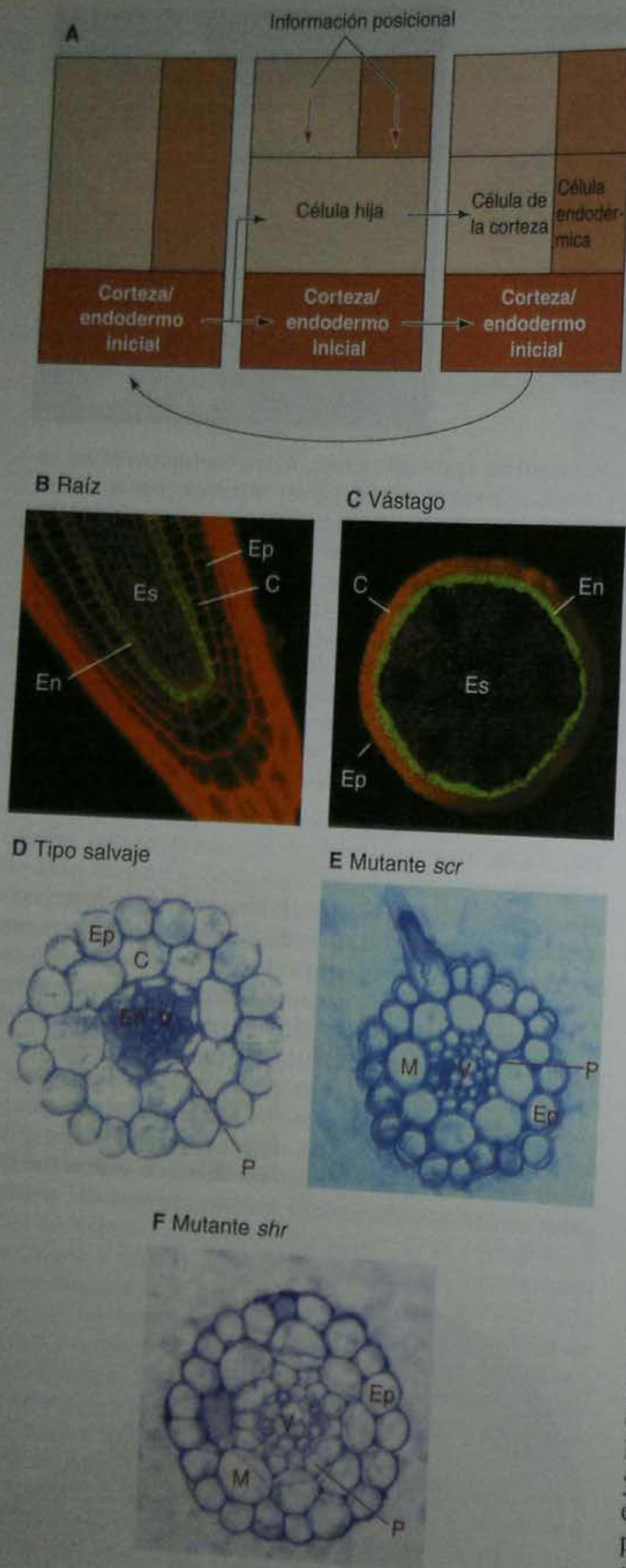


Fig. 20-28. *SCR* y *SHR* regulan la diferenciación endodérmica en el desarrollo radial de la raíz. **A.** Esquema de la división celular normal que produce células corticales y endodérmicas. *SCR* regula esta división celular asimétrica. **B, C.** Expresión de *SCR* en la raíz y en el vástago. El promotor de *SCR* está ligado al gen para GFP (proteína fluorescente verde). **D-F.** Secciones transversales de las raíces primarias de D, *Arabidopsis* tipo salvaje, E, el mutante *scr* y F, el mutante *shr*. Ep, epidermis; C, corteza; En, endodermo; M, capa mutante; P, periciclo; V, tejido vascular; Es, estela. (A, según Scheres y Heidstra 1999; B-F, microfotografías cortesía de P. Benfey.)

(Benfey 1999). Éste parece ser el caso para los genes *SCR* y *SHR*. En el vástago, estos genes son necesarios para la respuesta gravitrópica normal, que es dependiente de una normal formación del endodermo (un defecto en los mutantes de ambos genes; véase fig. 20-28C). Es importante tener en mente que hay un número de pasos entre el establecimiento del patrón básico y la elaboración del patrón en una estructura anatómica y morfológica. Sacar a la luz los mecanismos de control subyacentes probablemente sea la estrategia más productiva en la comprensión de cómo se desarrollan las raíces y los vástagos.

Desarrollo del vástago

Las exclusivas arquitecturas sobre la tierra de las diferentes especies de plantas tienen sus orígenes en los meristemas de los vástagos. La arquitectura del vástago es afectada por la cantidad de yemas axilares que se evaginan. Los patrones de ramificación están regulados por el extremo del vástago –un fenómeno denominado dominancia apical– y las hormonas de las plantas parecen ser los factores responsables. La auxina es producida por las hojas jóvenes y es transportada hacia la base de la hoja. Ésta puede suprimir la evaginación de las yemas axilares. El pastoreo y la floración a menudo liberan yemas desde la dominancia apical, en el momento en el que se está produciendo la ramificación. La **citoquinina** también puede liberar yemas desde la dominancia apical. Las yemas axilares pueden iniciar sus propias yemas axilares, de modo tal que pueden darse patrones de ramificación bastante complejos. Los patrones de ramificación pueden ser regulados por señales ambientales. Por ejemplo, un dosel en expansión en un área abierta maximiza la captura de la luz y se forman copas de árboles asimétricas cuando dos árboles crecen muy próximos entre sí. Además de esta plasticidad ambiental, la arquitectura del vástago está regulada genéticamente. En varias especies, se han identificado genes que regulan los patrones de ramificación.

El **primordio de la hoja** (grupos de células que formarán las hojas) se inicia en la periferia del meristema del vástago (véase fig. 20-25). La unión de una hoja al tallo se denomina **nudo** y el tejido del tallo entre los nudos se denomina **entrenudo** (véase fig. 20-24). En un sentido simplista, el esporofito maduro se crea por el apilamiento de unidades nudo/entrenudo. La **filotaxia**, el posicionamiento de las hojas sobre el tallo, involucra la comunicación entre los primordios de hoja existentes y los nuevos que se están formando. Las hojas pueden estar organizadas en varios patrones, incluyendo uno espiral, uno de 180° de sucesión alternada de hojas individuales, uno de pares, y verticilos de tres o más hojas en un nudo (Jean y Barabé 1998). La experimentación ha revelado un número de mecanismos para el mantenimiento geométricamente regular de espaciado de hojas sobre una planta, que incluye interacciones químicas y físicas de nuevos primordios de hojas con el ápice del vástago y con el primordio existente (Steeves y Sussex 1989).

No está claro cómo se da el inicio de un patrón específico de filotaxia. Los modelos matemáticos descriptivos pueden replicar los patrones observados, pero no revelan nada sobre el mecanismo. Los modelos biofísicos (por ejemplo, de los efectos del estrés/tensión sobre la depo-

sición del material de la pared celular, que afectan la división y la elongación celulares) intentan salvar esta distancia. Las aproximaciones de la genética del desarrollo son prometedoras, pero se han identificado pocos mutantes filotácticos. Un candidato es el mutante *terminal ear* en el maíz, que tiene una filotaxia irregular. El gen tipo salvaje es expresado en una región con forma de herradura, con un espacio donde se iniciará la hoja (Veit y col. 1998). El plano de la herradura es perpendicular al eje del tallo.

Desarrollo de la hoja

El desarrollo de la hoja incluye el compromiso a convertirse en hoja, el establecimiento de los ejes de la hoja y la morfogénesis, que da origen a una enorme diversidad de formas de hoja. Los experimentos de cultivos han evaluado cuando el primordio de la hoja se determina para desarrollarse en hoja. Las investigaciones sobre helechos y angiospermas indican que el primordio de hoja más joven visible no está determinado para producir una hoja; en su lugar, ese joven primordio en cultivos puede desarrollarse como vástagos (Steeves 1966; Smith 1984). La programación para el desarrollo de la hoja se produce tardíamente. La simetría radial del primordio de la hoja llega a ser dorsoventral, o aplanada, en todas las hojas. También se establecen los otros ejes, el proximodistal y el lateral. La forma única de las hojas es el resultado de la regulación de la división celular y de la expansión celular a medida que se desarrolla la hoja. Hay algunos casos en los que la muerte celular selectiva (apoptosis) está involucrada en el modelado de una hoja, pero el crecimiento celular diferencial parece ser un mecanismo más común (Gifford y Foster 1989).

ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN DORSOVENTRAL EN LAS HOJAS. Los biólogos de plantas se refieren a la superficie de la hoja que está más cercana al tallo como el lado adaxial y a la superficie más distante como el lado abaxial. Cuando se forma el primordio de la hoja, los genes de *Arabidopsis PHABULOSA* (*PHAB*) y *PHAVOLUTA* (*PHAV*) se transcriben inicialmente de manera uniforme en el primordio. Las proteínas PHAB y PHAV se postulan como receptores para una señal adaxial que lleva a la acumulación de PHAB y PHAV sobre la superficie adaxial de la hoja (fig. 20-29A; McConnell y col. 2001). Las secuencias de los genes *PHAB* y *PHAV* hacen esto probablemente al ser activadas por un ligando lipídico, y la activación es seguida por el desarrollo de células adaxiales. *KANADI* (*KAN*) inicia la diferenciación celular abaxial en *Arabidopsis* (Kerstetter y col. 2001). La hibridación in situ muestra que *KAN* es expresado transitoriamente sobre el lado abaxial de los cotiledones, de las hojas y que inicia el primordio del órgano floral (fig. 20-29B). *KAN* contiene un dominio GARP hallado en los factores de transcripción. El destino abaxial también parece ser especificado por miembros de la familia de genes *YABBY* (Siegfried y col. 1999). La proteína KAN enciende a los genes *YABBY*. La expresión del gen *KAN* está restringida al lado abaxial por PHAB y PHAV, mientras que la proteína KAN restringe la expresión génica de *PHAB* y *PHAV* al lado adaxial (fig. 20-29C).

GENÉTICA DE LA MORFOGÉNESIS DE LA HOJA. Las hojas se dividen en dos categorías, simples y compuestas (fig. 20-30; véase revisión por Sinha 1999). Hay una mayor variedad en la forma de la hoja simple, desde hojas de borde liso hasta hojas de roble profundamente lobuladas. Las hojas compuestas están formadas de folíolos en

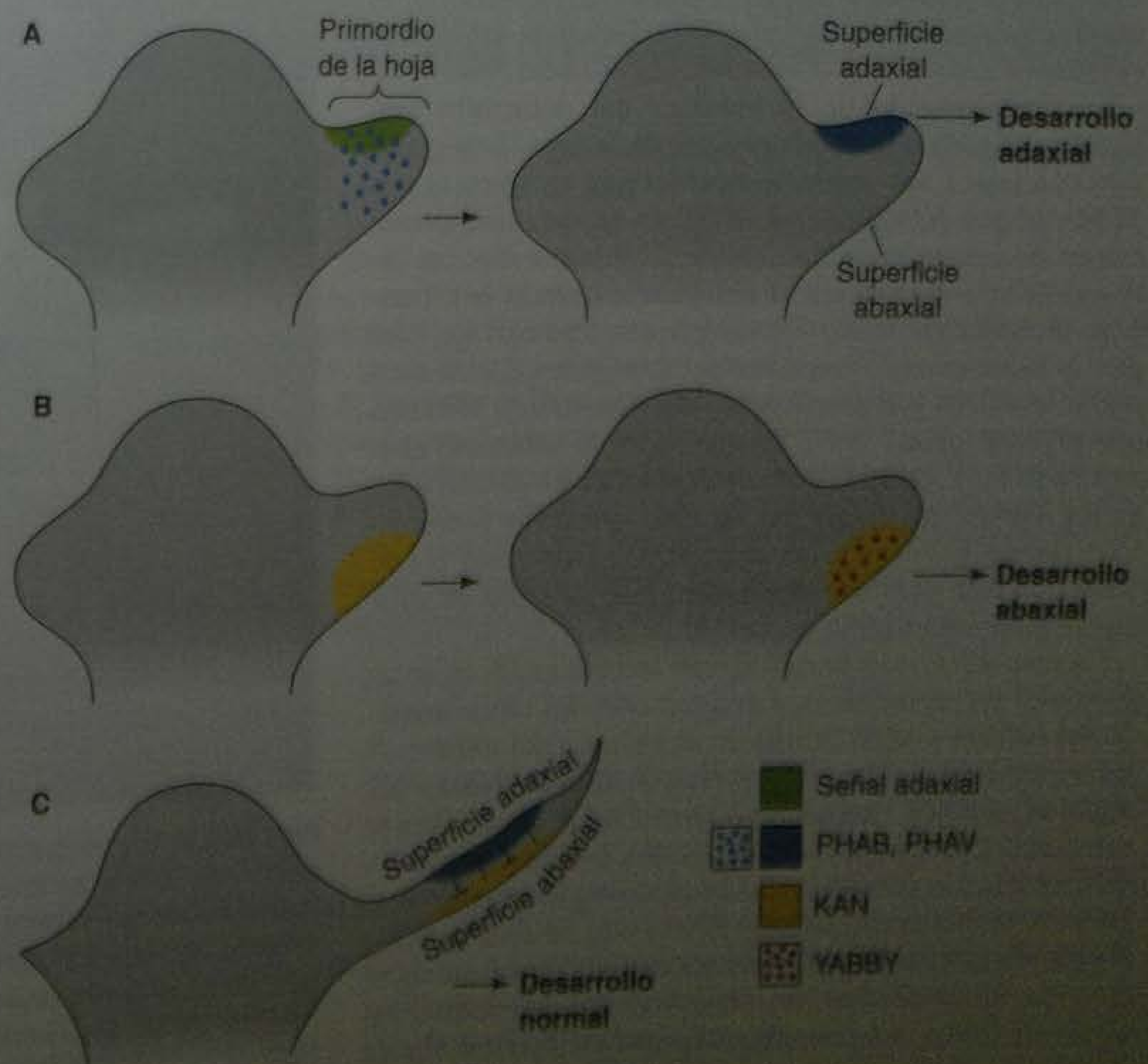
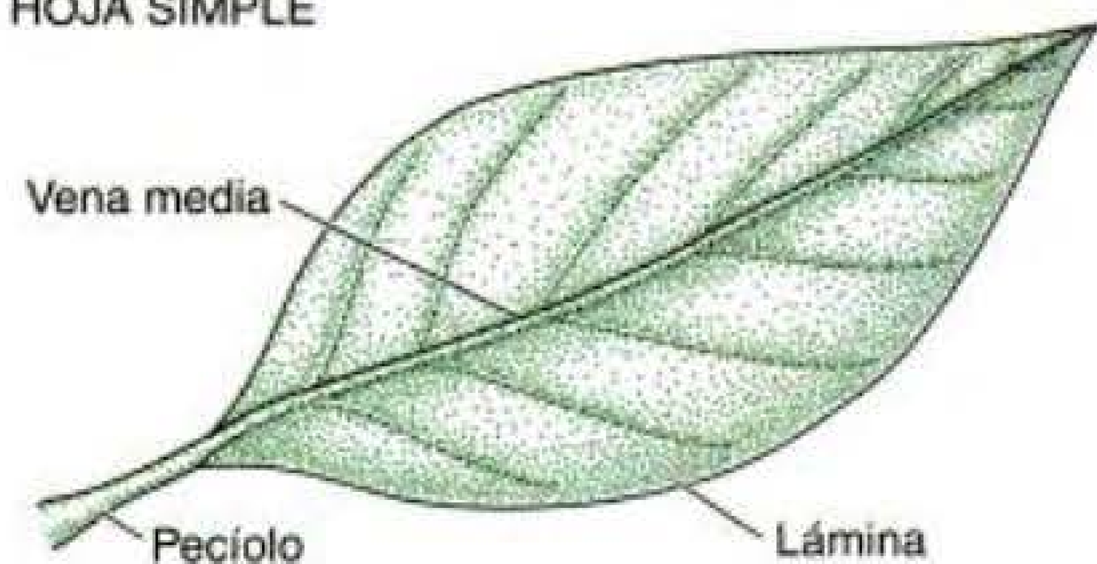


Fig. 20-29. Establecimiento del patrón adaxial y abaxial de las superficies de las hojas de *Arabidopsis*. **A.** Los RNA de *PHAB* y *PHAV* están uniformemente distribuidos a lo largo de todo el primordio de la hoja. Una señal sobre el lado adaxial del primordio de la hoja activa a las proteínas PHAB y PHAV, lo que lleva a la transcripción de los genes necesarios para el desarrollo adaxial. **B.** La expresión transitoria de *KAN* sobre el lado abaxial de la hoja lleva a la expresión de los genes *YABBY*, que a su vez llevan a la transcripción de otros genes abaxiales. **C.** PHAB y PHAV bloquean la actividad adaxial de *KAN*, y KAN, a su vez, bloquea la actividad abaxial de *PHAB* y *PHAV*. La expresión de los genes *PHAB*, *PHAV* y *KAN* es transitoria y se produce temprano en el desarrollo de la hoja.

HOJA SIMPLE



HOJA COMPUESTA

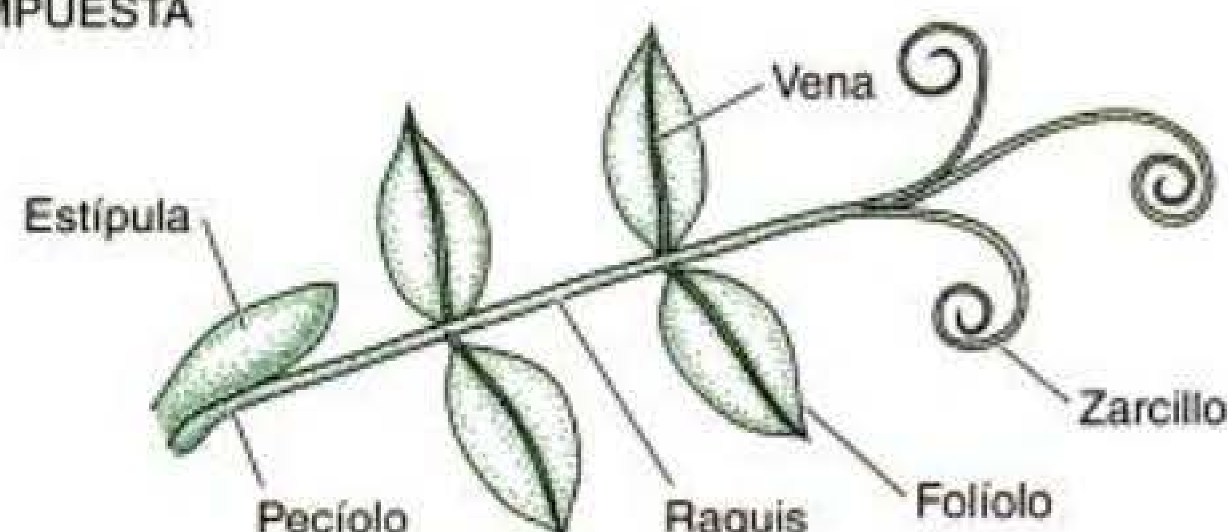


Fig. 20-30. Hojas simple y compuesta.

lugar de una única hoja. Si las hojas simples y compuestas se desarrollan por el mismo mecanismo es una pregunta abierta. Una perspectiva es que las hojas compuestas son hojas simples muy lobuladas. Una perspectiva alternativa es que las hojas compuestas son vástagos modificados. Se cree que el estado ancestral para las semillas de plantas es el compuesto, pero para las angiospermas es el simple. Las hojas compuestas se han originado en numerosos momentos en las angiospermas y no resulta claro si estos acontecimientos son reversiones hacia el estado ancestral.

La aproximación de la genética del desarrollo está siendo aplicada a la morfogénesis de la hoja. Los genes *KNOX* Clase 1 son genes homeobox que incluyen al gen *STM* y al gen *KNOTTED 1* (*KN1*) en el maíz. Las mutaciones de ganancia de función de *KN1* hacen que las estructuras tipo meristema se choquen causando la formación de hojas de maíz. En las plantas tipo salvaje, este gen se expresa en los meristemas. Los genes *KNOX* estimulan el inicio y el crecimiento del meristema. Mientras que algunos genes *YABBY* especifican la identidad abaxial de la hoja, otros funcionan regulando en menos a los genes *KNOX*, restringiendo de este modo los mecanismos donde se forman los meristemas (Kumaran y col. 2002). Si está presente demasiado *KN1*, *YABBY* es suficiente para controlar la expresión de *KN1*.

Cuando *KN1*, o su homólogo de tomate *LeT6*, tiene su promotor reemplazado con un promotor del virus mosaico del coliflor y se lo inserta en el genoma del tomate, el gen se expresa en elevados niveles en toda la planta y las hojas se vuelven "supercompuestas" (fig. 20-31; Hareven y col. 1996; Janssen y col. 1998). Las hojas simples se vuelven más lobuladas (pero no compuestas) en respuesta a la sobreexpresión de *KN1*, consistente con la hipótesis de que las hojas compuestas pueden ser un caso extremo de formación de lóbulos en las hojas simples (Jackson 1996). Sin embargo, el papel de *KN1* en el meristema del vástago y en el desarrollo de la hoja es consistente con la hipótesis de que las hojas compuestas son vástagos modificados. Examinando los patrones de expresión de *KN1* sobre un amplio rango del taxón angiosperma, Bharathan y colegas (2002) demostraron que la expresión de *KN1* está asociada con el primordio de la hoja compuesta, pero no está presente en el desarrollo del primordio de las hojas simples (fig. 20-32). Estos datos apoyan la conclusión de que las hojas compuestas mantienen una actividad tipo vástago, al menos por algún tiempo. Cómo funciona *KN1* en los meristemas y en el primordio de la hoja es un área de activa investigación. En las hojas de tomates, *KN1* provoca una disminución

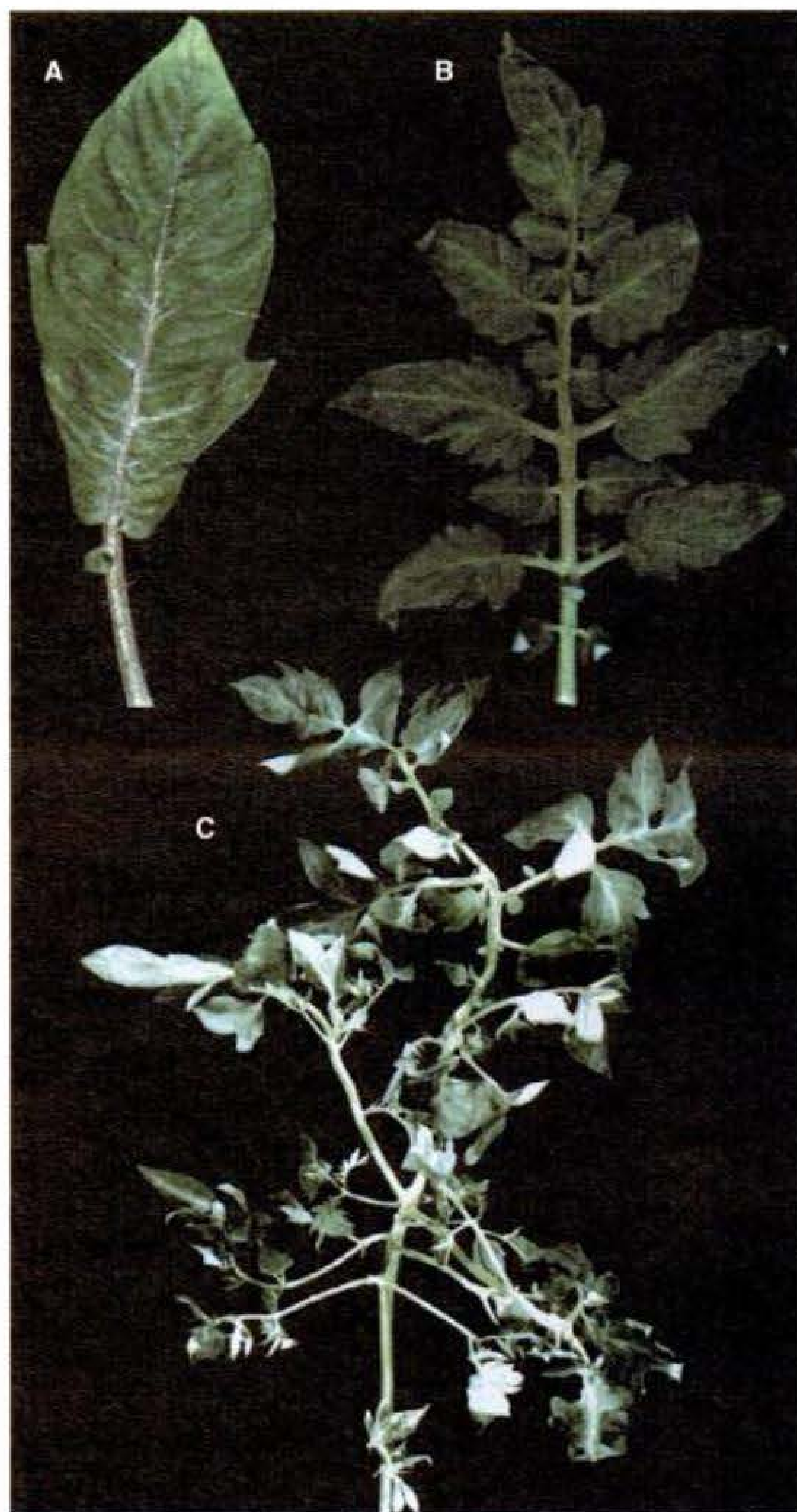


Fig. 20-31. Sobreexpresión de los genes *KNOX* clase 1 en las plantas de tomate. La fotografía muestra hojas individuales de **A**, una planta tipo salvaje, **B**, un mutante *mouse ears*, que incrementó la complejidad de la hoja y **C**, una planta transgénica que utiliza un promotor viral para sobreexpresar el gen homólogo del tomate (*LeT6*) del gen *KN1* del maíz. (Fotografías cortesía de N. Sinha.)

en la expresión del gen necesario para la producción de la hormona de planta ácido giberélico (Hay y col. 2002).

Un segundo gen, *LEAFY*, que es esencial para la transición desde el desarrollo vegetativo al reproductivo, también parece desempeñar un papel en el desarrollo de la hoja compuesta. Éste fue identificado en *Arabidopsis* y en boca de dragón (conejito o boca de sapo) (en el que éste se denomina *FLORICAULA*) y tiene homólogos en otras angiospermas. El homólogo de la arveja (guisante) (*UNIFOLIATA*) tiene un fenotipo mutante en el que las hojas compuestas están reducidas a hojas simples (Hofer y Ellis 1998). Este hallazgo también es indicativo de una relación regulatoria entre los vástagos y las hojas compuestas. En un fascinante giro evolutivo, *UNI* parece haber tomado el papel de *KN1* en el desarrollo de la hoja de la arveja (Bharathan y col. 2002). En esta legumbre sumamente derivada, *UNI* parece haber cooptado desde su papel en la floración.

En algunas hojas compuestas, también se toman las decisiones de desarrollo sobre la formación de hoja versus la de zarcillo. Las mutaciones de dos genes que dan forma a la hoja pueden individualmente y sumados alterar significativamente la morfología de la hoja compuesta de la arveja (fig. 20-33). La mutante *acacia* (*tl*) convierte los zarcillos en folíolos; *afilia* (*af*) convierte los folíolos a zarcillos (Marx 1987). El doble mutante *af tl* tiene una arquitectura compleja y se asemeja a una hoja de perejil.

A nivel microscópico, también están siendo estudiados el establecimiento del patrón de los estomas (aberturas para el intercambio de gas y agua) y tricomas (pelos) a través de la hoja. En monocotiledóneas, los estomas se forma en filas paralelas, mientras que en las dicotiledóneas la distribución parece más azarosa. En ambos casos, los patrones parecen maximizar la uniformidad de la distribución de los estomas. El análisis genético está proporcionando una aproximación hacia los mecanismos que regulan esta distribución. Un grupo de genes comunes parece estar funcionando en los vástagos y las raíces, que afecta el patrón de distribución de los tricomas y de los pelos de la raíz (Benfey 1999).

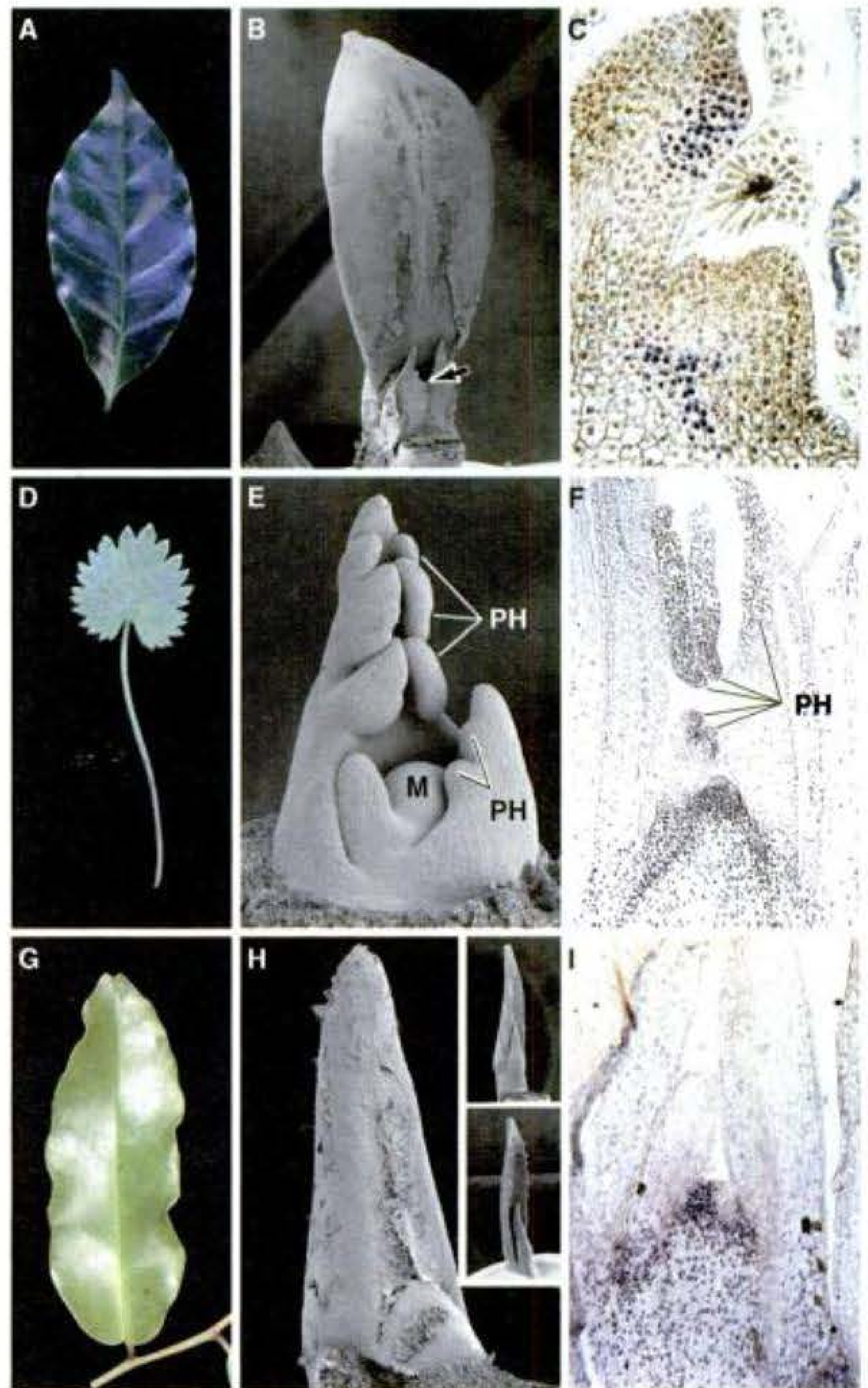


Fig. 20-32. Se sabe que la expresión del gen *KNOX* se produce en el primordio de la hoja en especies que producen hojas complejas. Aquí se muestra que las especies con hojas simples también pueden expresar *KNOX* en el primordio de la hoja que empieza siendo compleja pero que experimenta una alteración secundaria para convertirse en simple. **A.** Hoja simple de café. **B.** Microfotografía electrónica de barrido de un primordio (flecha) que muestra una complejidad temprana. **C.** Expresión de los genes *KNOX* en estas hojas tempranas. **D.** Hoja simple de anís. **E.** Microfotografía electrónica de barrido que muestra la complejidad temprana. **F.** Expresión de *KNOX* en estos primordios. **G.** *Amborella*, que muestra una hoja simple que es simple a lo largo de todo su desarrollo H. y que no tiene expresión de *KNOX* (I). PH, Primordio de la hoja; M, meristema. (De Bharathan y col. 2002; fotografías cortesía de Neelima Sinha.)

La transición vegetativa a reproductiva

A diferencia de algunos sistemas animales, en los que la línea germinal es separada durante la embriogénesis temprana, la línea germinal en las plantas se establece solo después de la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo, esto es, después de la floración. Las estructuras vegetativa y reproductiva del vástago son todas derivadas del meristema del vástago formado durante la embriogénesis. El análisis clonal indica que ninguna célula en el meristema del vástago del embrión es separada para ser utilizada solamente en la creación de estructuras reproductivas (McDaniel y Poethig 1988). En el maíz, la irradiación de las semillas causa cambios en la pigmentación de algunas células. Estas semillas dan origen a plantas que tienen sectores visualmente distinguibles que descienden de células mutantes. Tales sectores pueden extenderse desde la porción vegetativa de la planta hacia las regiones reproductivas (fig. 20-34), lo que indica que los embriones de maíz no tienen compartimentos reproductivos definidos.

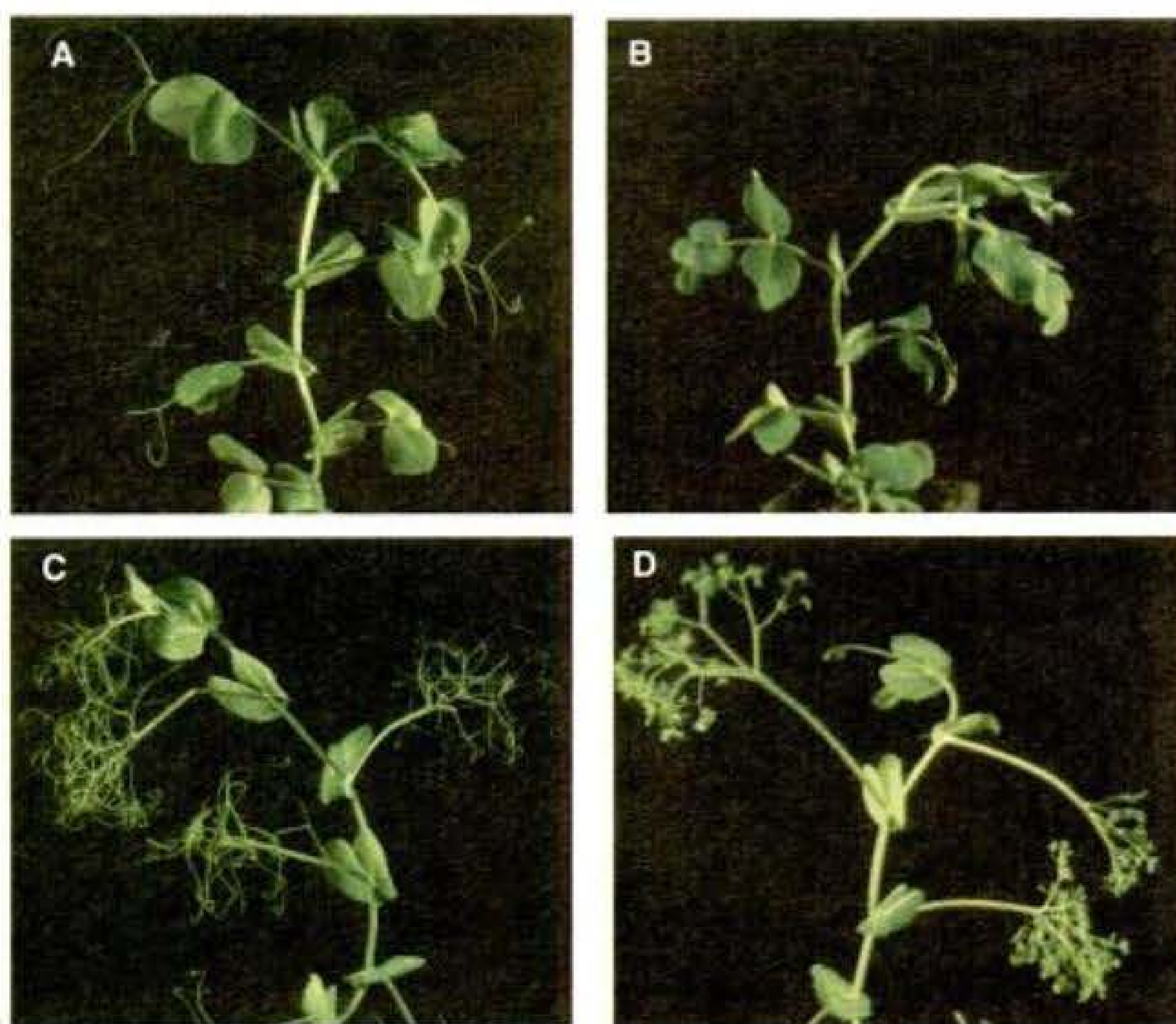


Fig. 20-33. Morfología de la hoja en mutantes de arvejas (guisantes). **A.** Planta de arveja tipo salvaje. **B.** El mutante *tl*, en el que los zarcillos se convierten en folíolos. **C.** El mutante *af*, en el que las hojas se convierten en zarcillos. **D.** Un doble mutante *af tl*, que tiene un fenotipo "hoja de perejil."

El máximo éxito reproductivo depende del ritmo de floración y el saldo, del número de semillas producidas con los recursos asignados a las semillas individuales. Como en los animales, diferentes estrategias funcionan mejor para diferentes organismos en diferentes ambientes. Hay una gran diversidad de patrones de floración entre cerca de 300.000 especies de angiospermas, aunque parece haber una conservación evolutiva subyacente de los genes de la floración y de los patrones de regulación de la floración.

Una explicación simplista del proceso de floración es que una señal desde las hojas se mueve hacia el ápice del vástago e induce la floración. En algunas especies, esta señal de floración es una respuesta a las condiciones ambientales. Los caminos de desarrollo que llevan a floración están regulados en numerosos puntos de control en diferentes órganos de la planta (raíces, cotiledones, hojas y ápices de vástago) en diferentes especies, que da como resultado una diversidad de tiempos de floración y de arquitecturas reproductivas (fig. 20-35). Sin embargo, la naturaleza de la señal de floración se mantiene desconocida. Hay evidencia de que RNA con funciones de desarrollo puede moverse a través del floema y que los papeles de pequeños trozos de RNA en la señalización de los mecanismos de desarrollo han sido reconocidos recientemente. Si esto jugará o no un papel en la floración es una pregunta abierta (Schauer y col. 2002).

Algunas plantas, especialmente las leñosas perennes, atraviesan una **fase juvenil**, durante la cual la planta no puede producir estructuras reproductivas incluso si todas las señales ambientales apropiadas están presentes (Lawson y Poethig 1995). La transición del estadio juvenil al adulto puede requerir la adquisición de competencia por las hojas o meristemas para responder a una señal interna o externa (McDaniel y col. 1992; Singer y col. 1992; Huala y Sussex 1993). Aún en las plantas herbáceas, hay un cambio de fase desde crecimiento juvenil a adulto vegetativo. Por ejemplo, el gen *early phase change* (*epc*) en el maíz es requerido para mantener el estado juvenil (Vega y col. 2002). Las plantas mutantes *epc* florecen temprano porque tienen pocas hojas juveniles, que se distinguen de las hojas del adulto por la presencia de cera y la ausencia de pelos. Sin embargo, los mutantes *epc* tienen el mismo número de hojas adultas que las plantas tipo salvaje. Las características juveniles no se expresan ante la ausencia de *epc*.

Control de la transición reproductiva

Los experimentos de injertos y de cultivo de órganos, el análisis de mutantes y los análisis moleculares brindan un marco para la descripción de la transición reproductiva. Los experimentos de injerto han identificado las fuentes de señales para promover o inhibir la floración y han proporcionado información sobre la adquisición de competencia de desarrollo del meristema para responder a estas señales (fig. 20-36; Lang y col. 1977; Singer y col. 1992; McDaniel y col. 1996; Reid y col. 1996). Los análisis de mutantes y la caracterización molecular de los genes están brindando información sobre las mecánicas de estos mecanismos de respuesta a la señal (Levy y Dean 1998; Hempel y col. 2000).

Las hojas producen una sustancia transmisible por el injerto que induce la floración. En algunas especies, esta señal se produce solamente bajo **fotoperíodos** específicos (duración del día), mientras que otras especies son de día neutro y florecerán bajo cualquier fotoperíodo (Zeevaart 1984). Sin embargo, no todas las hojas pueden ser competentes para percibir o pasar las señales fotoperiódicas. Los pigmentos de **fitocromo** transducen estas señales desde el ambiente externo. La estructura de los fitocromos es modificada por luz roja y luz roja lejana, y estos cambios pueden dar comienzo a una cascada de acontecimientos que llevan a la producción de promotor floral o de inhibidor floral (Deng y Quail 1999). Las hojas, los cotiledones y las raíces han sido identificados como fuentes de inhibidores florales en algunas especies (McDaniel y col. 1992; Reid y col. 1996). Se necesita un equilibrio crítico entre promotor e inhibidor para la transición reproductiva.

En algunas especies, los meristemas cambian en su competencia para responder a las señales de floración durante el desarrollo (Singer y col. 1992). La **vernalización**, un período de enfriamiento, puede potenciar la competencia de los vástagos y hojas para percibir o producir una señal de floración. La transición reproductiva depende de la competencia de ambos meristemas y de la intensidad de la señal (véase fig. 20-36). Los experimentos de cultivo de los extremos de vástago en varias espe-

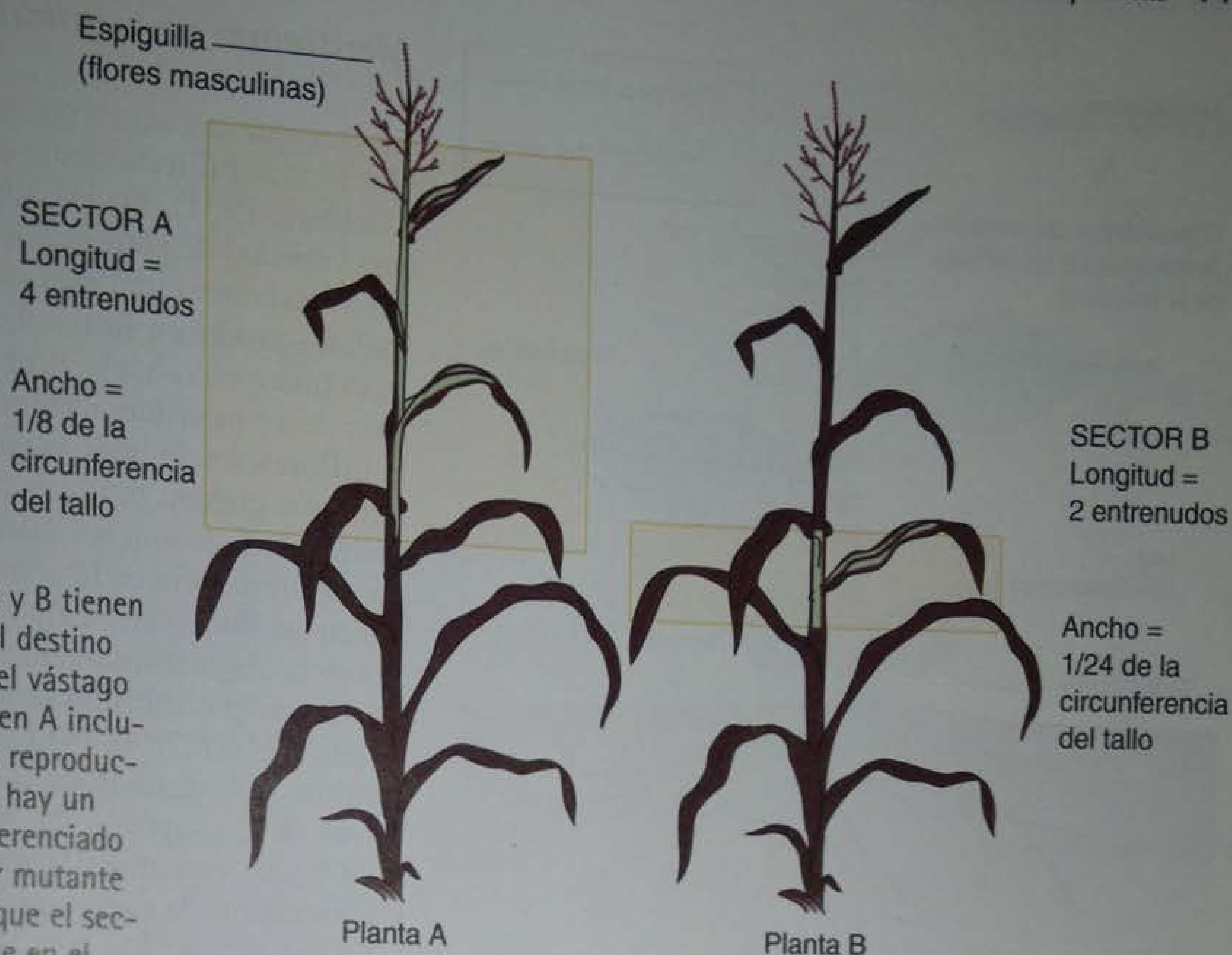






Fig. 20-34. El análisis clonal puede ser utilizado para construir un mapa de destino de un meristema apical del vástago en el maíz. Las semillas que son heterocigotas para ciertos genes de pigmentos (antocianinas) son irradiadas de modo tal que se pierde el alelo dominante en unas pocas células (una acontecimiento fortuito). Todas las células derivadas del mutante somático serán visualmente distintas de las células no mutantes. Las plantas A y B tienen sectores mutantes que revelan el destino de las células en el meristema del vástago de la semilla. El sector mutante en A incluye a los entrenudos vegetativo y reproductivo (espiguilla). Por lo tanto, no hay un compartimento de desarrollo diferenciado que forme la espiguilla. El sector mutante en A es más largo y más ancho que el sector mutante en B. Esto indica que en el meristema del vástago y en la semilla se apartaron más células para contribuir a los entrenudos más inferiores que a los superiores. El número real de células puede ser calculado tomando la cantidad recíproca de la fracción de la circunferencia del tallo que el sector ocupa. El sector A contribuye con 1/8 de la circunferencia del tallo; por lo tanto, 8 células fueron destinadas a contribuir a estos entrenudos en el meristema de la semilla. El sector B es solo 1/24 de la circunferencia del tallo; por lo tanto, 24 células fueron destinadas a contribuir a estos entrenudos. En este ejemplo, solamente están siendo analizadas las células derivadas de L1. También es importante considerar las posibles contribuciones de las capas de células de L2 y L3 del meristema del vástago. (Datos de McDaniel y Poethig 1988; fotografías cortesía de C. McDaniel.)

cies (que incluyen tabaco, girasol y arvejas) han demostrado que la determinación para la función reproductiva puede producirse antes de la morfogénesis reproductiva (revisión en McDaniel y col. 1992). Esto es, extremos de vástagos aislados que son determinados para el desarrollo reproductivo, pero son morfológicamente vegetativos, producirán in situ y en cultivos el mismo número de nudos antes de la floración (fig. 20-37).

La "caja negra" entre las señales ambientales y la producción de una flor está desapareciendo rápidamente, especialmente en la planta modelo *Arabidopsis* (fig. 20-38). Se están esclareciendo las vías de señalización a partir de la luz a través de diferentes fotocromos hasta genes clave en la floración. *CONSTANS (CO)* responde a la duración del día, promoviendo la floración bajo condiciones de día largo. Algunos de los genes que activan *CO* también son activados por factores de transcripción en otras vías de floración que no dependen de la luz. Las explicaciones moleculares están revelando vías redundantes que aseguran que la floración se producirá. En *Arabidopsis*, tres vías separadas llevan a que la floración esté siendo esclarecida. Se han disecado genéticamente vías que regulan la transición floral: una vía dependiente de la luz, una dependiente de la vernalización y una autónoma. La vía autónoma involucra las giberelinas (hormonas de las plantas). La disponibilidad de la secuencia del genoma de *Arabidopsis* ahora hace posible investigar en una amplia escala para clases de genes que regulan acontecimientos críticos tales como el tiempo de floración (Ratcliffe y Riechmann 2002). Otra aproximación prometedora es la búsqueda para loci de caracteres cuantitativos (QTL; del inglés, *quantitative trait loci*) que controlan la respuesta a los factores ambientales y hormonales. En *Arabidopsis* se utilizaron dos líneas para identificar genes, incluyendo una de adquisición salvaje que tenía una variación natural en la respuesta a la luz y a la hormona (Borevitz y col. 2002). Una vez que QTL fue mapeado, el mapa genómico permitió que su función con un gen específico fuera asociada con mayor probabilidad.

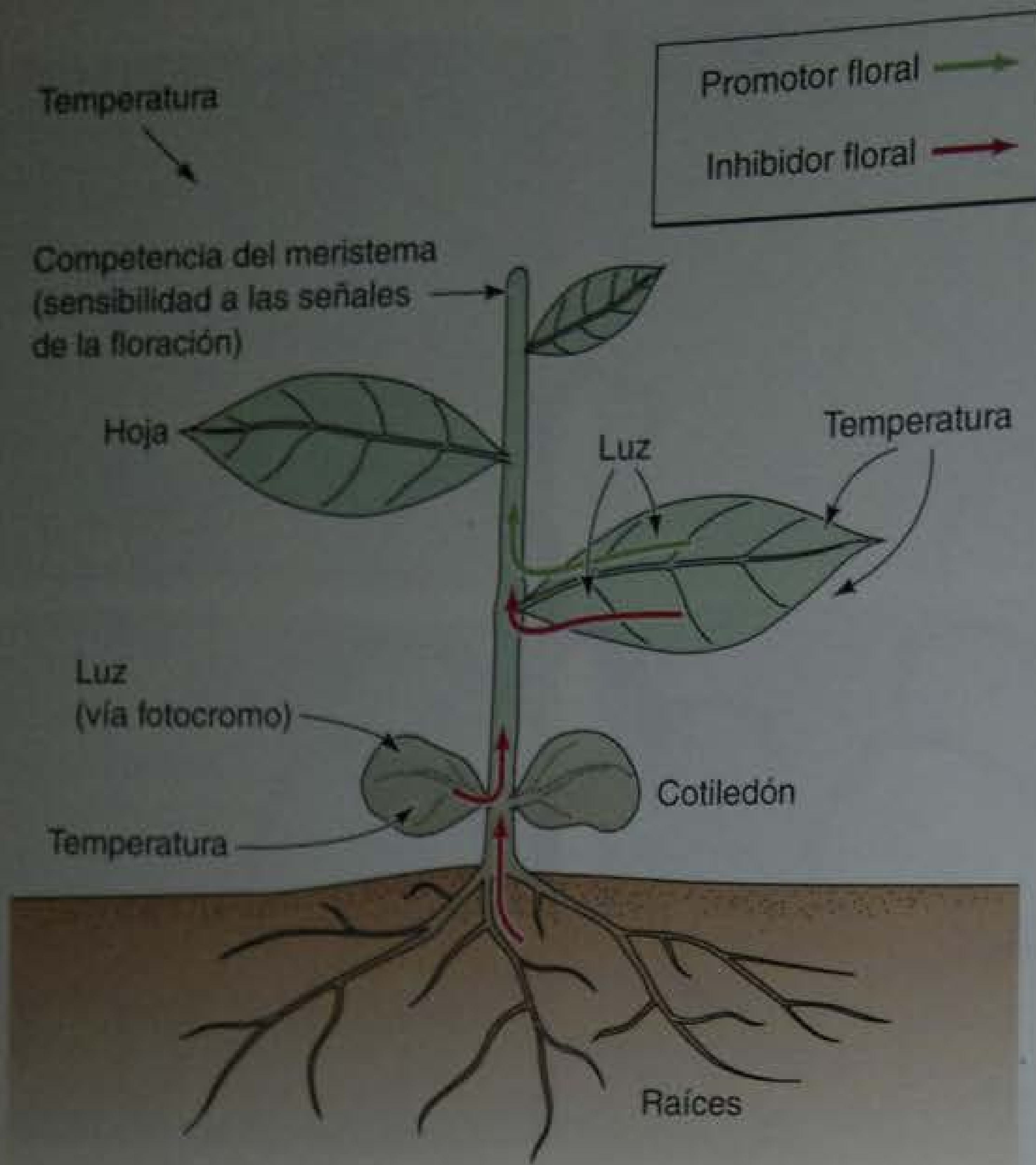


Fig. 20-35. Regulación de la transición vegetativa a reproductiva. Los factores internos y externos regulan si un meristema produce estructuras vegetativas o reproductivas. No todos los mecanismos regulatorios mostrados aquí se utilizan en todas las especies y algunas especies florecen independientemente de las señales ambientales externas. Las señales que promueven o inhiben la floración pueden desplazarse desde las raíces, cotiledones u hojas hacia el ápice del vástago, donde la competencia del meristema determina si la planta responderá o no a estas señales. Las hojas también necesitan desarrollar competencia para responder a las señales ambientales antes que puedan producir promotores florales.

Meristemas de la inflorescencia

Se cree que las angiospermas antiguas han formado una flor terminal directamente del ápice del vástago terminal (Stebbins 1974). En las angiospermas modernas, existe una variedad de patrones de floración en los que el ápice del vástago terminal está indeterminado, pero las yemas axilares producen flores. Esta observación introduce un paso intermedio hacia el proceso reproductivo: la transición de un meristema vegetativo hacia un **meristema de la inflorescencia**, que da comienzo a los meristemas axilares que pueden producir órganos florales, pero que no producen directamente ellos mismos las partes florales. La inflorescencia es la columna vertebral (tallo) que exponen las flores (véase fig. 20-24). El meristema de la inflorescencia probablemente se origina mediante la acción de un gen que suprime la formación de la flor terminal. El gen *CENTRORADIALUS* (*CEN*) en el boca de dragón suprime la formación de la flor terminal (Bradley y col. 1996). Éste suprime la expresión de *FLORICAULA* (*FLO*), que especifica la identidad del meristema floral. Curiosamente, la expresión de *FLO* es necesaria para que *CEN* sea encendido.

El homólogo de *CEN* de *Arabidopsis* (*TERMINAL FLOWER 1* o *TFL1*) también se expresa durante la fase vegetativa del desarrollo y tiene la función adicional de retrasar el compromiso hacia el desarrollo de la inflorescencia (Bradley y col. 1997). La sobreexpresión de *TFL1* en *Arabidopsis* transgénico se extiende hasta el momento anterior a la formación de la flor terminal (Ratcliffe y col. 1998). *TLF1* debe retrasar la transición reproductiva. Las arvejas de jardín se ramifican una vez más que las bocas de dragón antes de formar una flor. Esto significa que, los meristemas axilares no producen directamente

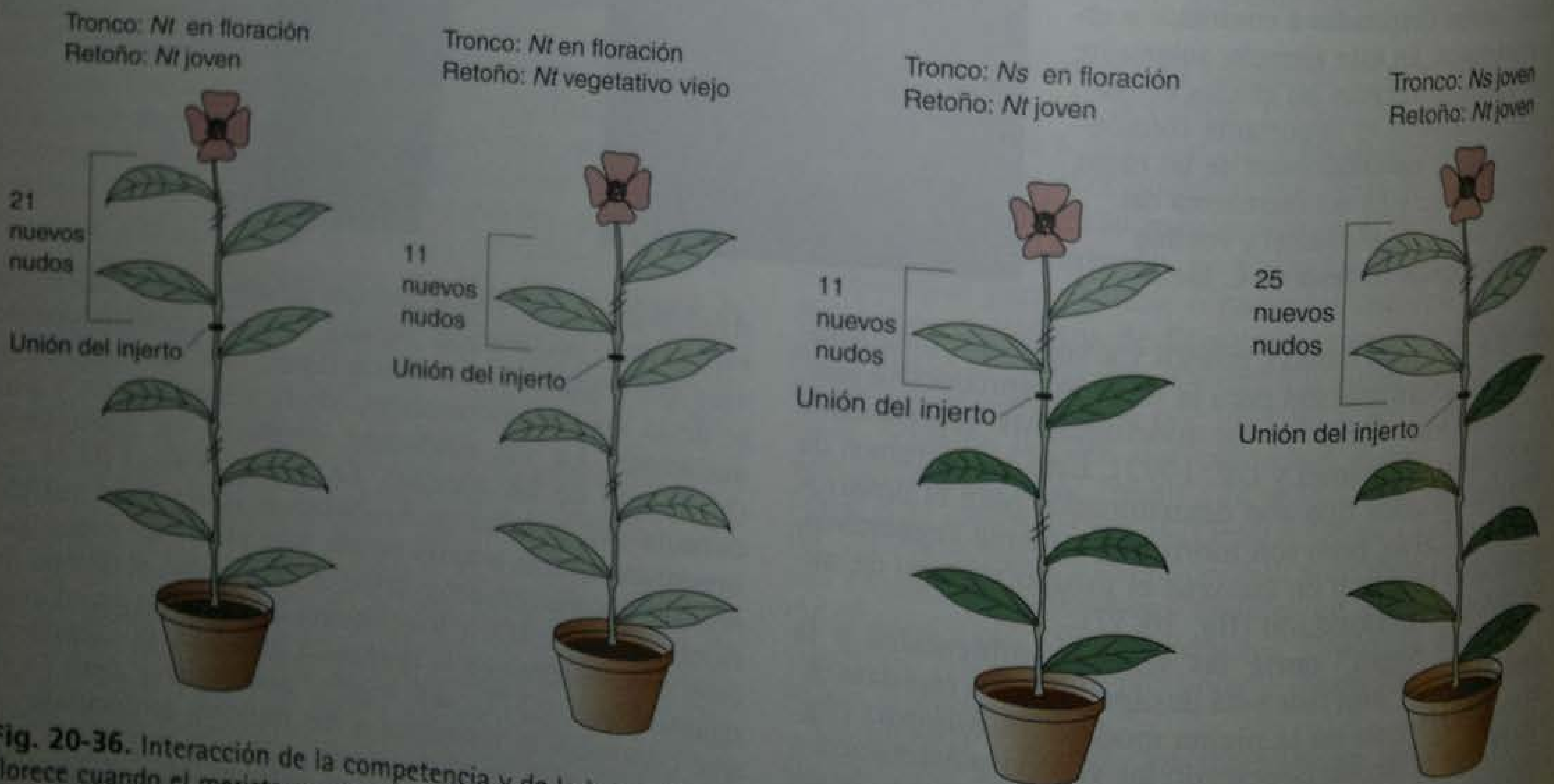


Fig. 20-36. Interacción de la competencia y de la intensidad de la señal. *Nicotiana tabacum* (*Nt*) es una planta de día neutro que florece cuando el meristema obtiene competencia para responder a las señales internas. *N silvestris* (*Ns*) es una planta de día largo que florece cuando la(s) señal(es) floral(es) alcanza un nivel crítico. Estos experimentos de injerto ilustran que un joven vástago *Nt* es menos competente para responder a la señal de floración de *Nt* que un vástago *Nt* más viejo. Los vástagos *Nt* jóvenes responden rápidamente a la señal de floración de las plantas *Ns* en floración, pero florecen tardíamente cuando se injertan a plantas *Ns* jóvenes con un bajo nivel de la señal. El retoño es el vástago injertado sobre el tronco; el tronco es la porción de la planta que echa raíces desde la cual ha sido extirpado el vástago. (Según Singer y col. 1992.)

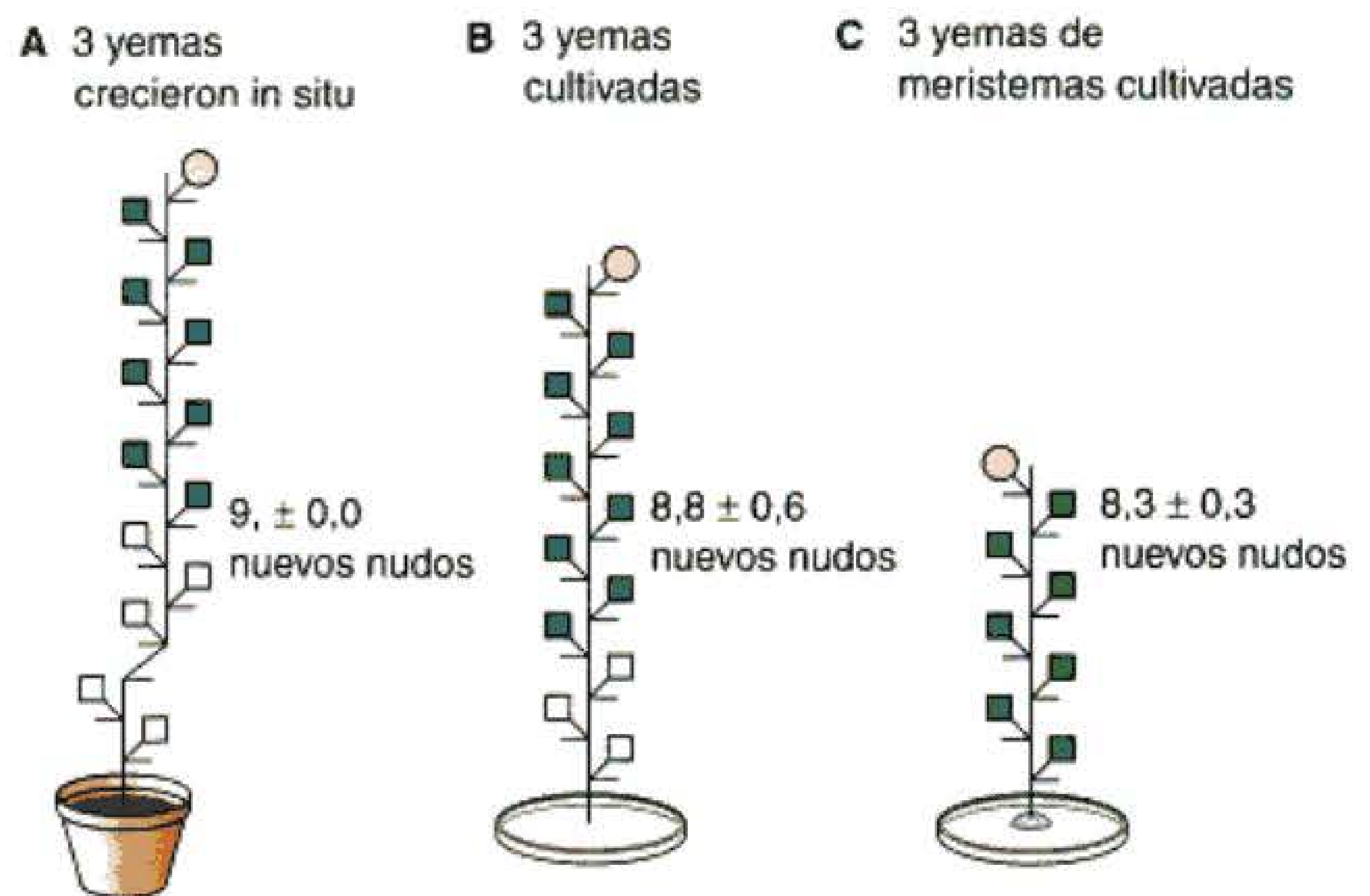
una flor, pero actúan como un meristema de inflorescencia que da comienzo a los meristemas florales. Dos genes, *DET* y *VEG1*, son responsables de esta inflorescencia más compleja y solamente cuando ambos no son funcionales se forma una flor terminal (fig. 20-39; Singer y col. 1996).

Genes de identidad del meristema floral

El siguiente paso en el proceso reproductivo es la especificación de los meristemas florales; los meristemas que en realidad producirán flores (Weigel 1995). En *Arabidopsis*, *LEAFY* (*LFY*), *APETALA 1* (*AP1*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*) son **genes de identidad del meristema floral** (fig. 20-40). *LFY* es el homólogo de *FLO* en la boca de dragón y su regulación en más durante el desarrollo es clave en la transición hacia el desarrollo reproductivo (Blázquez y col. 1997; Blázquez y Weigel 2000). El factor de transcripción *LFY* puede en realidad desplazarse entre las capas celulares en el meristema antes de activar a otros genes de floración (Sessions y col. 2000). El análisis del promotor de *LFY* revela que hay sitios separados para la activación por la vía de la duración del día y por la vía autónoma. La vía autónoma funciona a través de la unión de giberelina al promotor de *LFY*.

La expresión de genes de identidad del meristema floral es necesaria para la transición desde un meristema de inflorescencia hacia un meristema floral. Mutantes fuertes de *lfy* tienden a formar vástagos foliáceos en las axilas donde se forman flores en las plantas tipo salvaje; ellos son incapaces de hacer la transición hacia un desarrollo floral. Si se sobreexpresa *LFY*, la floración se produce temprano. Por ejemplo, cuando un álamo fue transformado con un gen *LFY* que fue expresado en toda la planta, el tiempo de floración se acortó significativamente de años a meses (Weigel y Nilsson 1995). *AP1* y *CAL* son genes estrechamente relacionados y redundantes. El mutante *cal* se parece a la planta tipo salvaje, pero los dobles mutantes de *ap1 cal* producen inflorescencias que se parecen a cabezas de coliflor (fig. 20-41). Más recientemente se ha caracterizado otro gen, *FRUITFUL* (*FUL*), con una cercana secuencia semejante a *AP1* y a *CAL*. La familia del gen *FUL* está estrechamente relacionada a la familia del gen *AP1* en angiospermas y más probablemente se originó como resultado de duplicación génica y divergencia. Ésta es también parcialmente redundante a *AP1* y *CAL* (Ferrandiz y col. 2000). Sin embargo, *CAL* se originó solamente dentro de *Brassica* mediante un acontecimiento de duplicación del gen *AP1* y parece estar acompañado de la domesticación del coliflor y el brócoli (Purugganan y col. 2000).

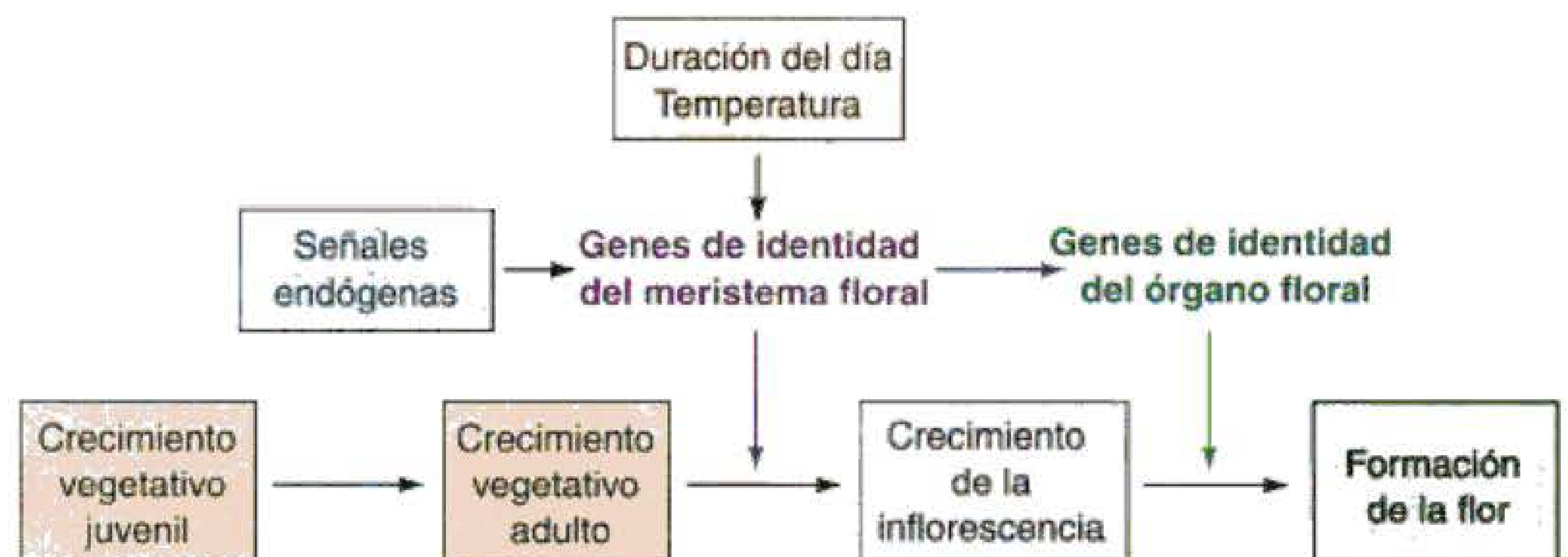
Fig. 20-37. Determinación para el desarrollo reproductivo. En este experimento, las yemas de tres nudos desde la base de las plantas de arvejas fueron tratadas cuando las plantas tenían tres hojas expandidas. Estas yemas fueron determinadas para el desarrollo reproductivo y produjeron el mismo número de nudos A, cuando se les permitió crecer in situ al extirpar el vástago terminal; B, cuando fueron extirpadas de la planta y cultivadas; y C, cuando solo se cultivó la yema del meristema. Si estas yemas no habían sido comprometidas hacia un desarrollo reproductivo, deberían haber desarrollado yemas tipo vegetativas y producido muchos más nudos antes de la floración.



Genes de identidad de órgano: el modelo ABC

Los genes de identidad del meristema floral inician una cascada de expresión génica que activa a genes que especifican una región (cadastral), con un patrón más específico para iniciar la transcripción de **genes de identidad**

Fig. 20-38. Las diferentes fases del crecimiento del vástago están reguladas por señales ambientales y endógenas. Los meristemas adultos pueden expresar genes de identidad del meristema floral en respuesta a la duración del día, temperatura y señales internas, incluidas giberelinas. Estos genes activan a genes adicionales que llevan a la expresión de genes de identidad del órgano floral, esencial para la producción de sépalos, pétalos, estambres y carpelos.



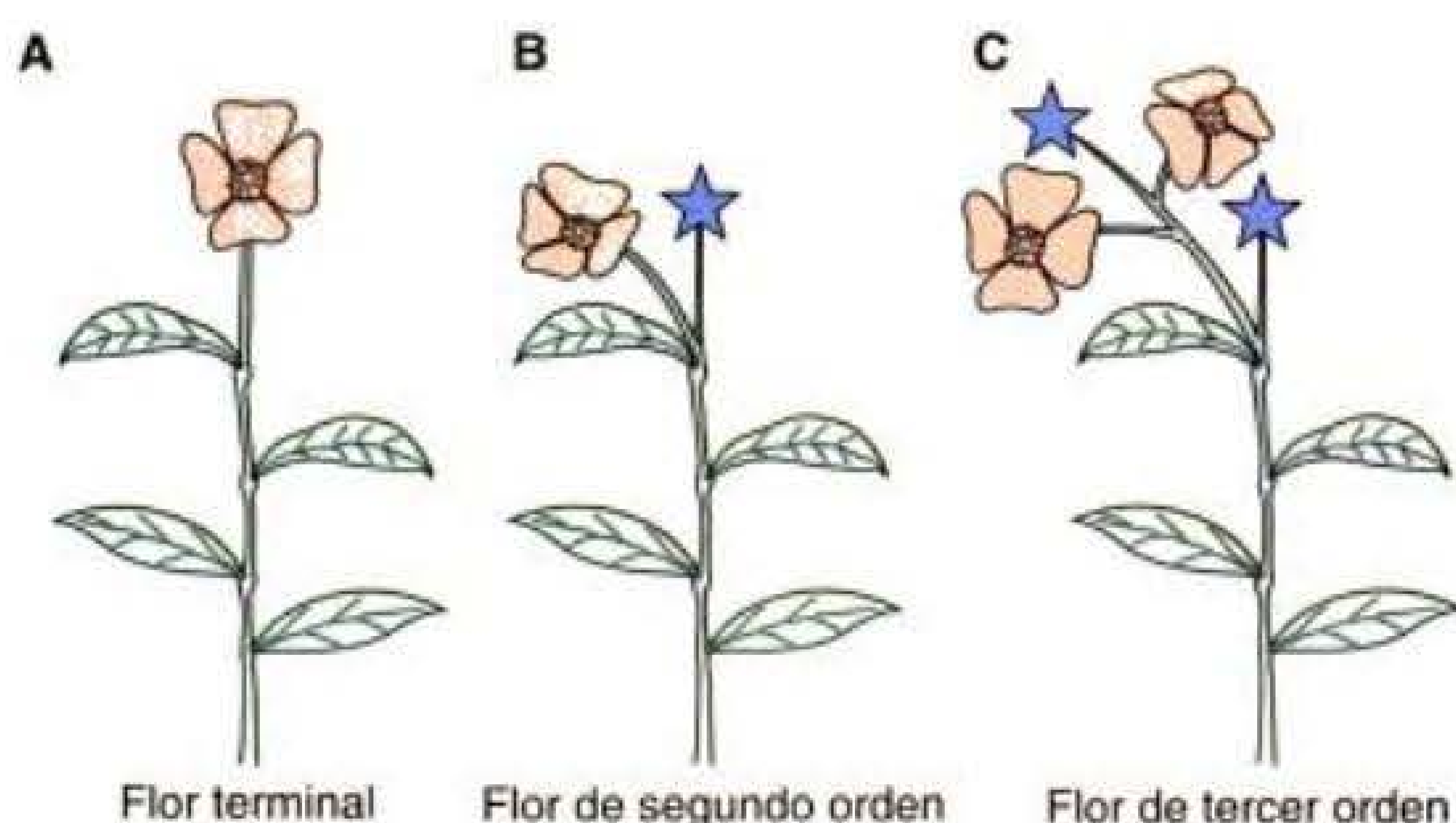


Fig. 20-39. Regulación de la arquitectura de ramificación de la inflorescencia. **A.** En las angiospermas más simples, se forma una flor terminal directamente desde el ápice del vástago terminal. **B.** *Arabidopsis* y boca de dragón producen flores sobre las ramificaciones axilares (flores de segundo orden). **C.** En las arvejas, las ramificaciones axilares crecen e inician la floración (flores de tercer orden), pero no producen flores directamente. Evidencia reciente sugiere que los patrones de ramificación más complejos en las inflorescencias son el resultado de la supresión de la expresión de genes de floración en los meristemas. Las estrellas indican meristemas donde se suprime la expresión del gen floral. En *Arabidopsis* y boca de dragón (**A**), un solo gen suprime la floración en el meristema de primer orden. En las arvejas (**B**), dos genes son necesarios para suprimir la floración en los meristemas de primero y segundo orden.

del órgano floral (Weigel 1995). *SUPERMAN* (*SUP*) es un ejemplo de gen cadastral en *Arabidopsis*, que juega un papel en la especificación de límites por la expresión de genes de identidad de órgano. Se necesitan tres clases de genes de identidad de órgano (A, B y C) para especificar los cuatro verticilos de los órganos florales (figs. 20-42 y 20-43; Coen y Meyerowitz 1991). Ellos son genes homeóticos (pero no genes Hox; en su lugar, la mayoría es miembro de la familia génica de **caja MADS** (*MADS box*), que tuvieron sus orígenes antes de la divergencia de animales y plantas). En *Arabidopsis*, estos genes incluyen *AP2*, *AGAMOUS* (*AG*), *AP3* y *PISTILLATA* (*PI*). Los genes clase A (*AP2*) solos especifican el desarrollo del sépalo. Los genes de la clase A y los genes de la clase B (*AP3* y *PI*) juntos especifican los pétalos. Los genes de la clase B y de la clase C (*AG*) son necesarios para la formación del estambre; los genes de la clase C solos especifican la formación del carpelo. Cuando no se expresa ninguno de estos genes homeóticos en el desarrollo de la flor, las partes florales se convierten en estructuras tipo hojas. Los genes ABC codifican para factores de transcripción que inician una cascada de acontecimientos que llevan a la producción real de las partes florales.

Aunque el modelo ABC es convincente, no es suficiente para sostener la hipótesis de que las flores evolucionaron de las hojas. La sobreexpresión de los genes ABC en las hojas no produce pétalos u otras partes de la flor. Cerca de una década después de haberse propuesto el modelo ABC, se identificó una cuarta clase de genes de identidad de órganos florales, *SEPALLATA* (*SEP*) (fig. 20-44; véase revisión por Jack 2001). Estos genes de caja MADS pueden convertir una hoja en un pétalo cuando son expresados ectópicamente en la hoja. Ante la ausencia de la función de *SEP*, las flores se convierten en verticilos de sépalos. Los factores de transcripción SEP forman dímeros con ABC o los factores de transcripción SEP inician el desarrollo floral.

Además de los genes de clase ABC y SEP, ahora se están investigando los genes de clase D que regulan específicamente el desarrollo del óvulo. El óvulo evolucionó mucho tiempo antes de que las otras partes florales de la angiosperma y, mientras que el desarrollo está coordinado con el del carpelo, uno debería esperar que existan más vías independientes ancestrales.

La transcripción de genes de identidad de órgano floral es en realidad el comienzo más que el final del desarrollo de la flor. Uno de los atributos emocionantes de las angiospermas es la enorme diversidad de fenotipos de flores, muchos de los cuales han evolucionado para atraer a polinizadores específicos. La asimetría adaxial/abaxial en las flores es un factor que contribuye a la diversidad de morfologías florales. La evidencia filogenética indica que ésta es una característica originada independientemente muchas veces, así como también se ha visto perdida muchas veces. La clonación del gen *CYCLOIDEA* (*CYC*) en la boca de dragón ha llevado a una amplia discusión acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la evolu-

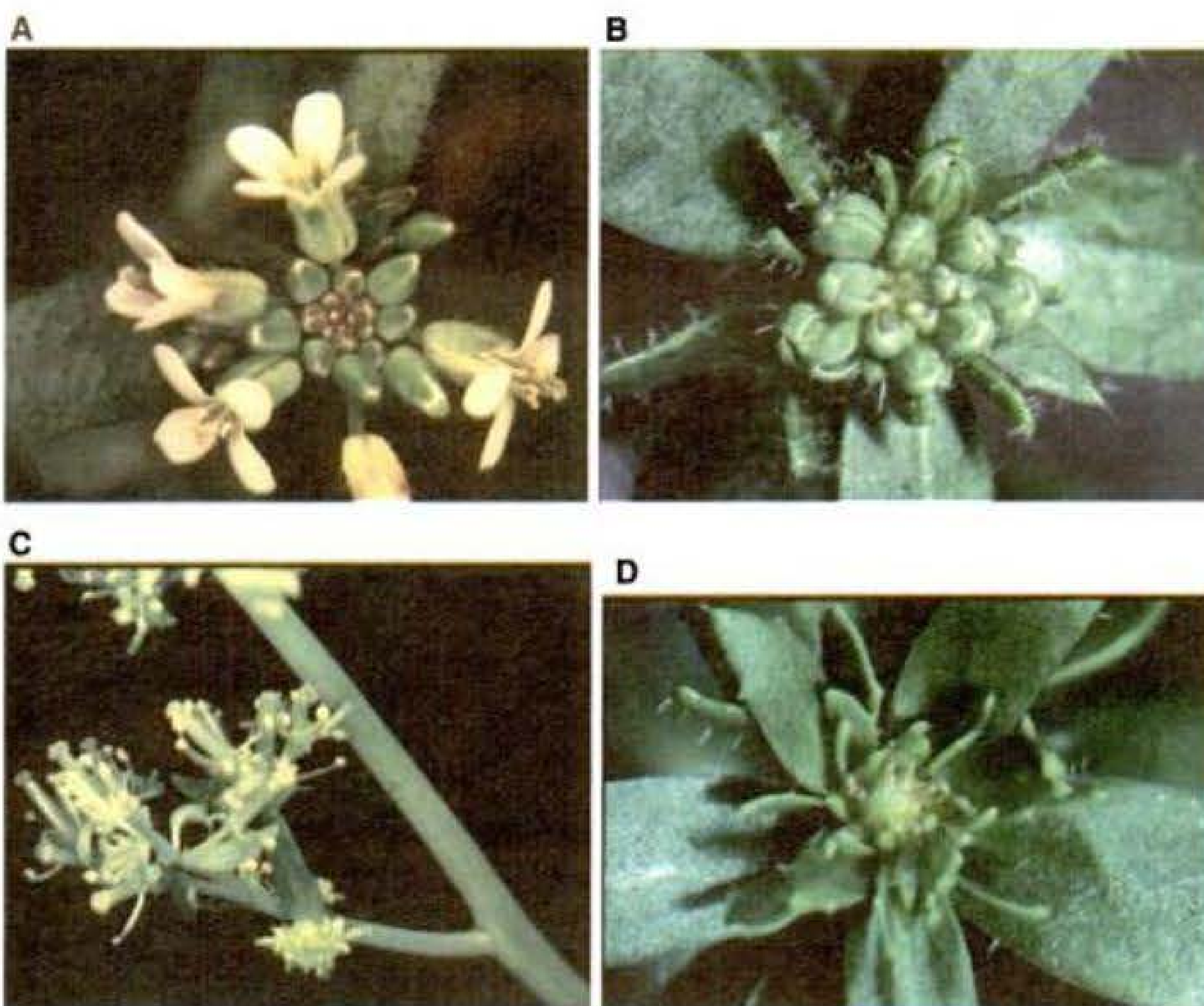


Fig. 20-40. Mutantes de identidad del meristema floral. **A.** *Arabidopsis* tipo salvaje. **B.** Mutante *leafy*. **C.** Mutante *apetala1*. **D.** Doble mutante *leafy apetala1*. (Fotografías cortesía de J. Bowman.)

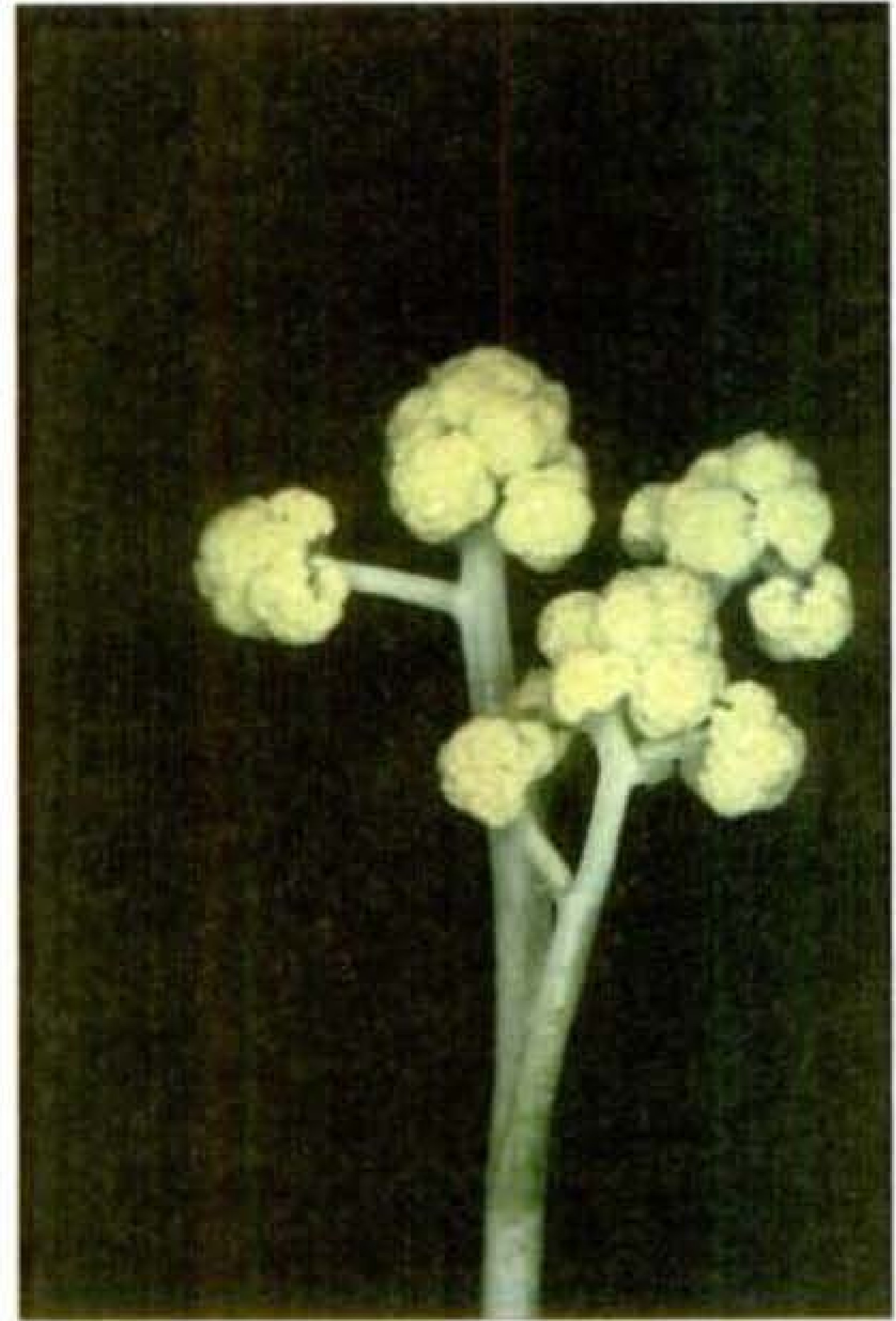


Fig. 20-41. Doble mutante *ap1* y *cal* de *Arabidopsis*. Debido a que *cal* solo da un fenotipo tipo salvaje, el doble mutante demuestra la redundancia de estos dos genes en la vía de la floración. (Fotografía cortesía de J. Bowman.)

ción de la asimetría (Donoghue y col. 1998; Cubas y col. 2001). En la boca de dragón, la expresión de *CYC* se observa temprano en el desarrollo sobre el lado adaxial del primordio floral. En los mutantes *cyc*, las flores tienen una simetría más radial. ¿*CYC* ha evolucionado independientemente numerosas veces o existen muchos caminos para producir una asimetría floral? Se han identificado en otras especies a supuestos *CYC* ortólogos y una explicación convincente para los múltiples orígenes de la asimetría es que este gen fue reclutado para la misma función múltiples veces. La combinación de las aproximaciones de desarrollo y filogenéticas para el estudio del establecimiento del patrón de las plantas promete proporcionar una comprensión hacia los orígenes de las novedades morfológicas que son muy extensas entre las angiospermas.

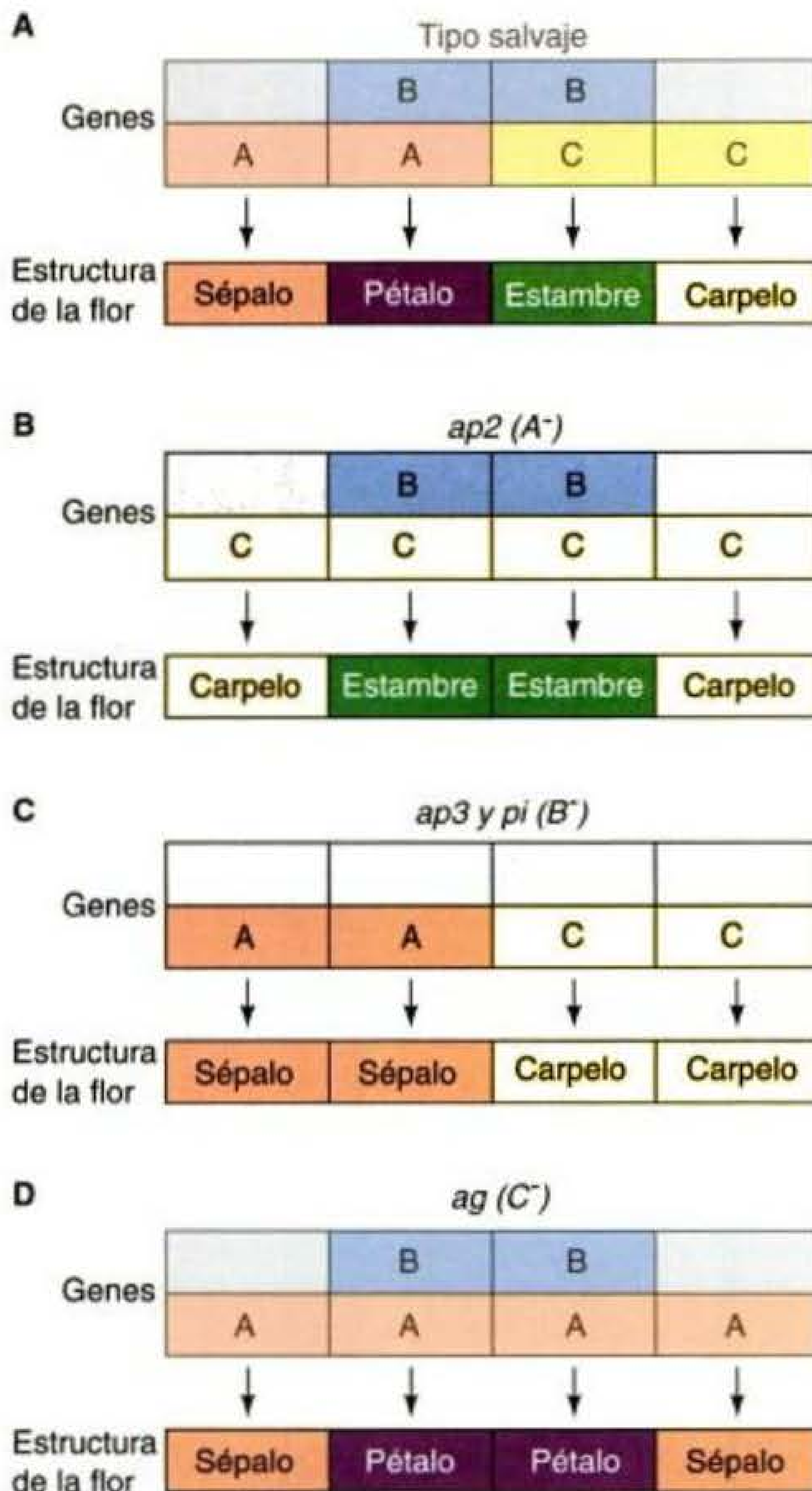












Fig. 20-42. Fenotipos mutante y tipo salvaje de *Arabidopsis* de los genes de identidad de órgano floral clase A (*ap2*), clase B (*ap3, pi*) y clase C (*ag*). (Modelo propuesto por Coen y Meyerowitz 1991; fotografías cortesía de J. Bowman.)

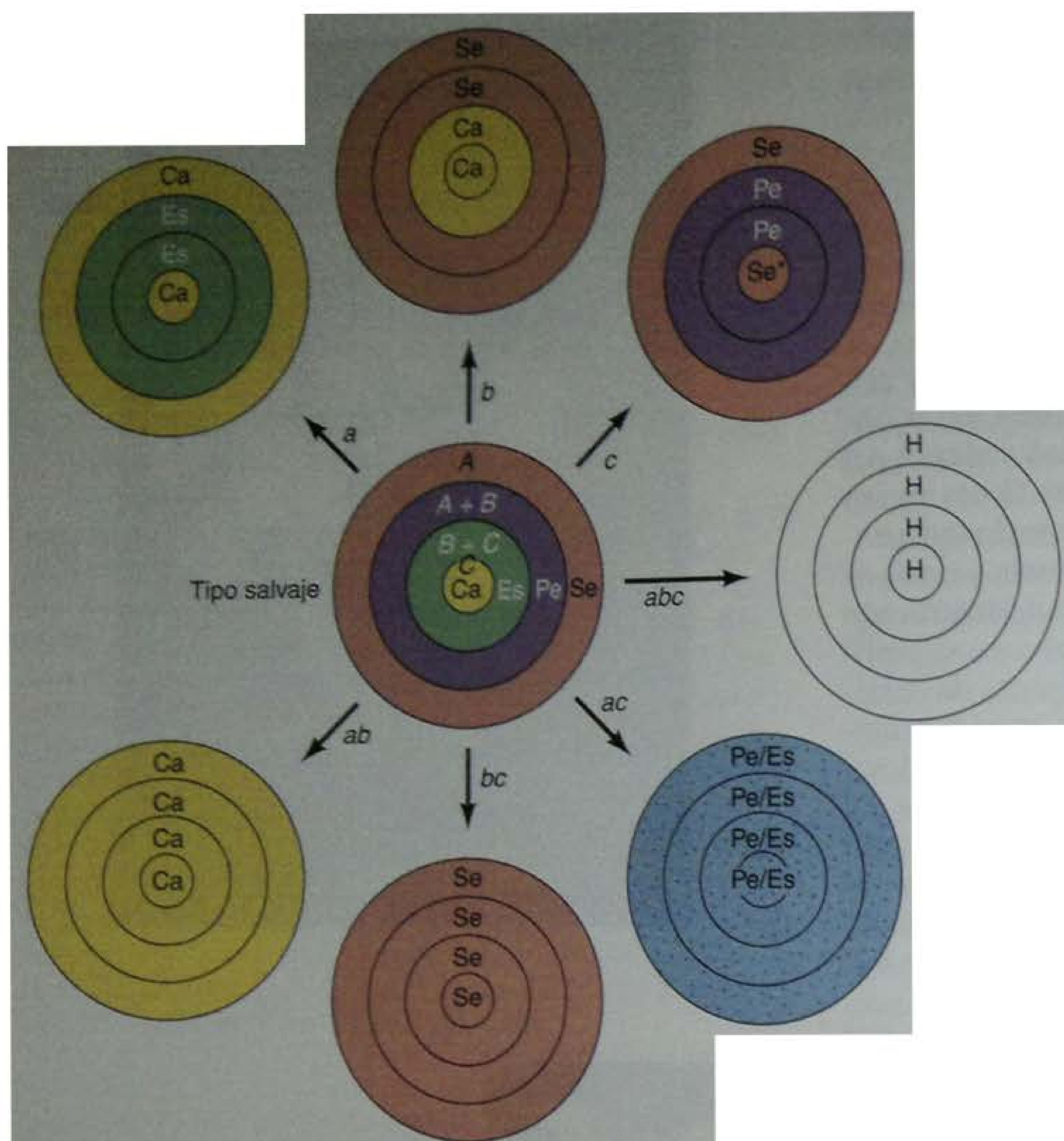


Fig. 20-43. Modelo ABC para la especificación del órgano floral. Tres clases de genes –A, B y C– regulan la identidad de órgano en las flores. El esquema central representa la flor tipo salvaje; los esquemas que lo rodean representan mutantes que han perdido una o más de estas funciones de genes (indicado por las letras minúsculas *a*, *b* o *c*). Se, sépalo; Pe, pétalo; Es, estambre; Ca, carpelo; Pe/Es, un híbrido pétalo/estambre; H, hoja; Se*, un sépalo modificado que indica que otros genes (posiblemente genes del óvulo) pueden regular la especificación del órgano floral. (Datos de Coen y Meyerowitz 1991.)

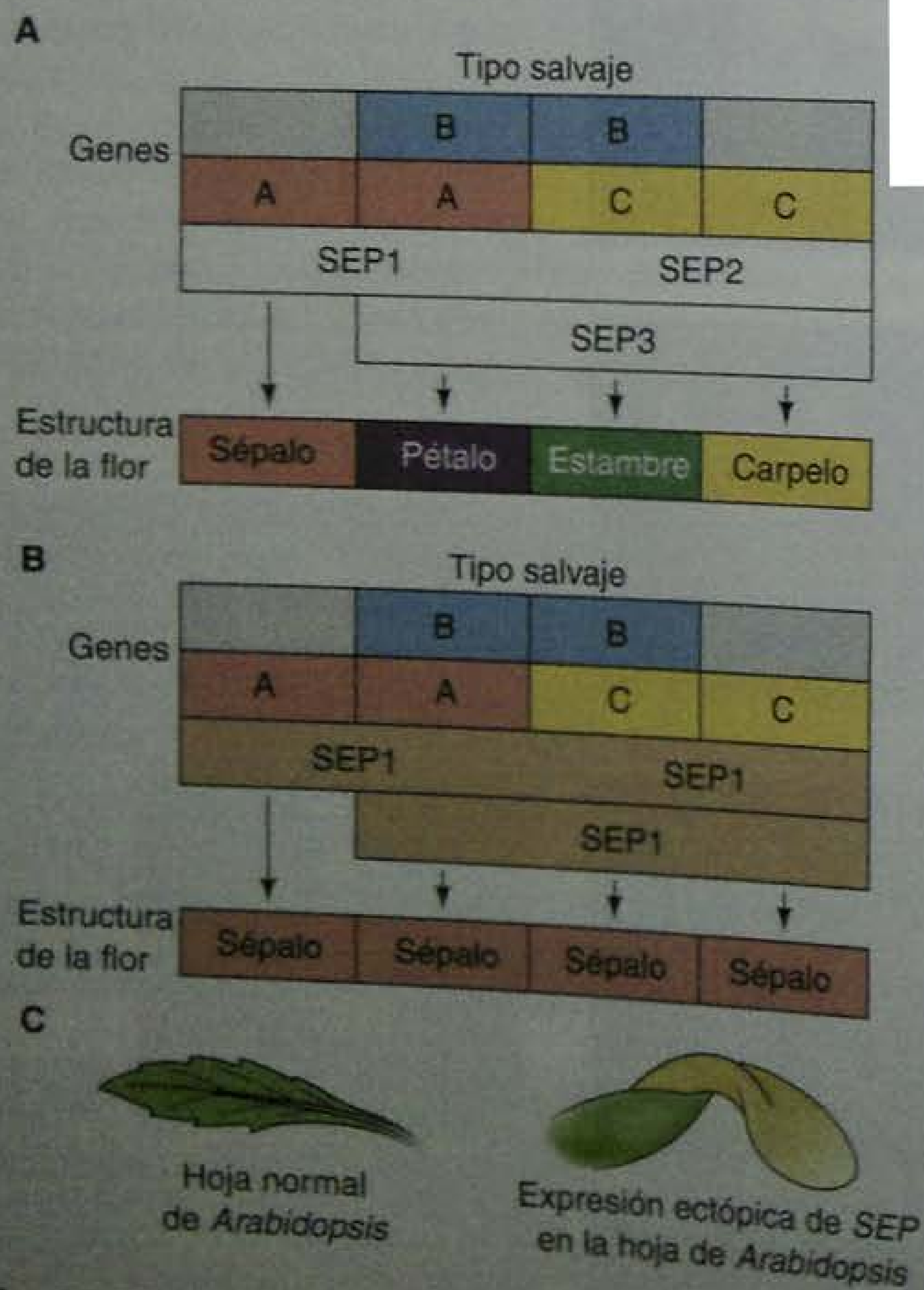


Fig. 20-44. Los genes *SEPALLATA* (*SEP*) son una cuarta clase de genes de identidad del órgano floral. **A.** Las plantas de *Ara-bidopsis sep1 sep2 sep3* producen verticilos de sépalos en lugar de los otros tres órganos florales. **B.** Expresión ectópica de los tres genes *SEP* en las hojas lleva a la conversión de las hojas a pétalos, como se muestra en **C**.

Senescencia

La floración y la senescencia (un programa de desarrollo que lleva a la muerte) están estrechamente relacionadas en muchas angiospermas. En algunas especies, la senescencia de los pétalos de flores individuales sigue a la polinización. Las orquídeas, que se mantienen frescas por largos períodos si no son polinizadas, son un buen ejemplo. La maduración de la fruta (y finalmente su posmadurez) es un ejemplo de senescencia de órgano. La senescencia de la totalidad de la planta lleva a la muerte de toda la generación del esporofito. Las plantas **monocárpicas** florecen y luego entran en senescencia. Las plantas **policárpicas** tales como el pino de cono erizado puede vivir por miles de años (4900 años es el récord actual) y tener floraciones reiteradamente.

En las plantas policárpicas, la muerte es por accidente; en las plantas monocárpicas, ésta parece ser genéticamente programada. Las flores y los frutos juegan un papel clave en el proceso y su extirpación a veces puede demorar su senescencia. En algunas legumbres, la senescencia puede demorarse al extirpar la semilla en desarrollo –en otras palabras, el embrión puede desencadenar la senescencia en la planta progenitora. Durante la floración y el desarrollo del fruto, los nutrientes son redistribuidos desde otras partes de la planta para soportar el desarrollo de la siguiente generación. Las estructuras reproductivas acaban con los nutrientes y esto puede llevar a que toda la planta entre

Resumen: desarrollo de la planta

1. Las plantas de vida terrestre tiene sus orígenes en las charophytas, un linaje de algas verdes de agua dulce.
2. Las plantas están caracterizadas por la alternancia de generaciones; esto es, sus ciclos de vida incluyen generaciones multicelulares haploides y diploides.
3. Un esporofito diploide multicelular produce esporas mediante meiosis. Las esporas se dividen mitóticamente para producir un gametofito haploide. Las divisiones mitóticas dentro del gametofito producen los gametos. El esporofito diploide resulta de la fusión de dos gametos.
4. Las plantas de vida terrestre han evolucionado mecanismos para proteger a los embriones. Los embriones de angiosperma se desarrollan profundamente embebidos en el tejido progenitor. El tejido progenitor proporciona nutrientes, pero solo mínima información de establecimiento de patrón. Este aspecto evolutivo de una protección aumentada del embrión es compartido por plantas y animales.
5. En las angiospermas, el gameto masculino (polen) arriba al estilo del gametofito femenino y lleva a cabo la fecundación a través del tubo polínico. Dos espermatozoides se mueven a través del tubo polínico, uno se une con la ovocélula para formar el cigoto y el otro está involucrado en la formación del endosperma.
6. La embriogénesis temprana generalmente está caracterizada por el establecimiento del eje vástago-raíz y por el establecimiento de un patrón radial que deriva en los tres sistemas de tejidos. El patrón surge mediante la regulación de los planos de división celular y de las direcciones de expansión celular, debido a que las células de las plantas no se mueven durante el desarrollo.
7. A medida que madura el embrión de angiosperma, se establece una reserva de comida. Solo en el momento en el que cesa la embriogénesis y que la semilla entra en latencia se establecen los rudimentos del plan corporal básico.
8. El patrón se elabora durante el desarrollo posembrionario, cuando los meristemas construyen la estructuras repetidas de la planta.
9. A diferencia de los animales, la línea germinal de la planta no se separa tempranamente en el desarrollo. La coordinación de la señalización entre los meristemas de las hojas, raíces y vástagos regula la transición hacia el estado reproductivo.
10. Los genes de identidad del meristema floral y los genes de identidad de órgano le permiten a la flor de angiosperma exponer una enorme cantidad de diversidad morfológica.
11. La reproducción puede ser seguida por la senescencia programada genéticamente de la planta progenitora.

Bibliografía citada

Alessa, L. and D. L. K}opf. 1999. F-actin marks the rhizoid pole in living Pelvetia compressa zygotes. Development 126: 201-209.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408: 796-815.

Barton, M. K. and R. S. Poethig. 1993. Formation of the shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana: An analysis of development in the wild-type and in the shoot meristemless mutant. Development 119: 823-831.

Belanger, K. D. and R. S. Quatrano. 2000. Polarity: The role of localized secretion. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 67-72.

Benfey, P. N.1999. Is the shoot a root with a view? Curr. Opin. Plant Biol. 2: 39-43.

Benfey, P. N., P. J. Linstead, K. Roberts, J. W. Schiefelbein, M.-T. Hauser and R. A. Aeschbacher. 1993. Root development in Arabidopsis: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. Development 119: 53-70.

Bharathan, G., T. E. Goliber, C. Moore, S. Kessler, T. Pham and N. R. Sinha. 2002. Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. Science 296: 1858-1860.

Bhattacharyya, M. K., A. M. Smith, T. H. N. Ellis C. Hedley and C. Martin. 1990. The wrinkled seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. Cell 60: 115-122.

Blázquez, M. A. and D. Weigel. 2000. Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. Nature 404: 889-892.

Blázquez, M. A., L. N. Soowai, I. Lee and D. Weigel.1997. LEAFYexpression and flower initiation in Arabidopsis. Development 124: 3835-3844.

Borevitz, J. O. and 9 others. 2002. Quantitative trait loci controlling light and hormone response in two accessions of Arabidopsis thaliana. Genetics 160: 683-696

Bowman, J. 1994. Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development. Springer-Verlag, New York.

Bradley, D., R. Carpenter, L. Copsey, C. Vincent, S. Rothstein and E. Coen. 1996. Control of inflorescence architecture in Antirrhinum. Nature 379: 791-797.

Bradley, D., O. Ratcliffe, C. Vincent, R. Carpenter and E. Coen. 1997. Inflorescence commitment and architecture in Arabidopsis. Science 275: 803.

Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ions in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50: 859-863.

Brown, K. S. 1999. Deep Green rewrites evolutionary history of plants. Science 285: 990-991.

Brownlee, C. and F. Berger. 1995. Extracellular matrix and pattern in plant embryos:

Capítulo 21 Implicaciones médicas de la biología del desarrollo

Estoy hecho temerosamente y maravillosamente.
SALMO 139
(alrededor de 500 a.C.)

Es todo de una pieza, talidomida y pesticidas. Ellos representan nuestro gusto por adelantarnos precipitadamente a utilizar algo sin saber cuál será el resultado.
RACHEL CARSON (1962)

El futuro ya está aquí. Éste todavía casi no ha sido distribuido.
WILLIAM GIBSON (1999)

UNA DE LAS NUEVAS ÁREAS DE LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO involucra el uso médico del conocimiento del desarrollo de mamíferos adquirido recientemente. Este conocimiento tiene numerosas aplicaciones médicas, que incluyen:

- La regulación de la fertilidad.
- La identificación de los defectos genéticos que afectan el desarrollo.
- La identificación de compuestos teratogénicos que afectan el desarrollo.
- La identificación de factores en el ambiente materno que pueden influir sobre la salud del feto.
- La comprensión de que los cánceres pueden ser alteraciones de la regulación del desarrollo que podrían ser curados a través de los procesos de desarrollo.
- El intento de detectar las enfermedades del desarrollo (incluidos cánceres) y de curarlos mediante clonación, terapia de célula madre e ingeniería genética.
- El intento de curar las enfermedades traumáticas y degenerativas mediante regeneración.*

Cuando se discuten los aspectos médicos de cualquier ciencia, se debe tener en cuenta el problema social, así como el puramente científico. Las discusiones en relación a cómo deben ser controladas las enfermedades genéticas, los cánceres o la infertilidad también origina móviles y oportunidades de orden social, político y económico.

INFERTILIDAD

Diagnóstico de infertilidad

La **infertilidad** –la incapacidad para conseguir o mantener el embarazo– no es una enfermedad en el usual sentido de la palabra. No es un síntoma o afección que impide el bienestar físico de individuos o de parejas infértiles. Sin embargo, debido a que el deseo de tener un hijo puede ser excepcionalmente fuerte por razones biológicas y sociales (en efecto, han caído imperios debi-

* La mayor parte del material en este capítulo es de naturaleza médica y mientras que intenta proporcionar información sobre estos tópicos, este capítulo no trata de proporcionar asesoramientos médicos para personas o desórdenes específicos. Este capítulo tampoco se propone condensar toda la embriología médica hacia una sola unidad. En su lugar, trata de resumir los principios particulares que serán utilizados en el estudio del desarrollo normal o anormal de cualquier órgano humano. Para textos de embriología médica más completos véanse Dudek y Fix (1998), Moore y col. (1998), Carlson (1999), Sadler y Langman (2000) y Larsen y col. (2001).

do a la infertilidad) es, sin lugar a dudas, una afección importante en nuestra sociedad y, frecuentemente, es controlada en el contexto de la medicina clínica.

No hay una definición precisa de infertilidad, En su lugar, la infertilidad es la ausencia de embarazo después de un tiempo apropiado de intento de concepción mediante relaciones sexuales regulares. Esta duración difiere entre las culturas y dentro de éstas. La curva de concepción de la población revela que el 80% de las parejas alcanzará la concepción en 12 meses y el 90%, en 18 meses. El 10% restante puede ser rotulado como que tiene infertilidad, o "subfertilidad," pero en los 6 meses siguientes cerca de la mitad de este grupo "infértil" alcanza el embarazo.

La infertilidad puede ser causada por el fracaso para ovular o madurar al ovocito, por pocos espermatozoides o que éstos sean defectuosos, mediante el bloqueo físico de los conductos masculinos o femeninos o por incompatibilidades entre el espermatozoide y el entorno del ovocito o del tracto reproductivo (McVeigh y Barlow 2000). Mientras que hay numerosos tratamientos para las mujeres que pueden llevar a la maduración y ovulación de los ovocitos, hay relativamente pocos tratamientos para los hombres que no están produciendo suficientes espermatozoides. En las mujeres, las gonadotrofinas exógenas o las drogas antiestrogénicas (clomifeno o tamoxifeno), pueden ser utilizadas para estimular los ovarios. En los hombres, los espermatozoides pueden ser concentrados e inyectados en el ovocito o en el tracto reproductivo cerca del ovocito.

Fecundación in vitro (FIV)

La **fecundación in vitro (FIV)** es un tratamiento de la infertilidad en el que los ovocitos y espermatozoides son recuperados de los progenitores masculino y femenino, y colocados juntos en una placa de petri para la fecundación. Después de que los ovocitos han comenzado a dividirse, son transferidos hacia el útero del progenitor femenino, donde se produce la implantación y el desarrollo embrionario como en un embarazo normal.

FIV fue desarrollada en los comienzos de la década de 1970 para tratar la infertilidad causada por las trompas de Falopio bloqueadas o dañadas. El primer bebé por FIV, Louise Brown, nació en Inglaterra en 1978. Desde entonces, el número de procedimientos por FIV llevados a cabo cada año se ha incrementado y se ha mejorado significativamente el porcentaje de éxito. El índice de éxito se compara favorablemente con el porcentaje de embarazos naturales en cualquier mes cuando la mujer está por debajo de la edad de 40 años y no hay problemas de espermatozoides (véase Trounson y Gardner 2000).

Debido a que FIV fue la primera **tecnología de reproducción asistida** desarrollada y ampliamente publicitada, mucha gente cree erróneamente que FIV es la única opción de tratamiento para las parejas infértiles. En la actualidad, menos del 3 por ciento de todos los pacientes que buscan tratamientos para infertilidad reciben FIV. La mayoría de las parejas infértiles responde bien a opciones de tratamientos menos complicadas, tales como terapias hormonales e inseminación artificial. FIV sigue siendo el procedimiento de las técnicas de reproducción asistida utilizado más frecuentemente.

Procedimiento de FIV

El procedimiento de FIV tiene cuatro pasos básicos, resumidos a continuación y en la figura 21-1.

- **Paso 1: Estimulación y monitoreo ovárico.** Al tener varios ovocitos maduros viables para FIV se incrementa la posibilidad de que al menos uno resultará en un embarazo. Típicamente, las gonadotrofinas o antiestrógenos son utilizados para "hiperestimular" a los ovarios a producir varios ovocitos maduros.
- **Paso 2: Recuperación del ovocito.** Una vez que el folículo ha madurado (pero todavía no se ha roto), el médico trata de recuperar tantos ovocitos como le sea posible. Aunque ellos son denominados frecuentemente óvulos, los gametos femeninos cerca de ser ovulados están en realidad en metafase II (ovocitos) (véase cap. 19). El médico recupera a los ovocitos al guiar una pipeta de aspiración para cada folículo maduro y aspirar el ovocito. Una vez que se recupera el ovocito, los que están maduros y sanos son transferidos a un recipiente estéril para esperar a la fecundación en el laboratorio.
- **Paso 3: Fecundación.** Una muestra de semen es recogida del progenitor masculino aproximadamente 2 horas antes de la recuperación del ovocito del progenitor femenino. Estos espermatozoides luego son procesados (un procedimiento denominado lavado de espermatozoides) utilizando varias técnicas. El lavado de espermatozoides capacita a los espermatozoides y selecciona solo a los espermatozoides más sanos y más activos de la muestra. Los espermatozoides seleccionados luego son colocados en una placa de petri con los ovocitos, y los gametos son incubados a la temperatura corporal. Si la fecundación es exitosa, los cigotos comenzarán a dividirse y el embrión resultante poco tiempo después estará listo para ser transferido hacia el útero.
- **Paso 4: Transferencia del embrión.** La transferencia del embrión no es un procedimiento complicado y puede llevarse a cabo sin anestesia. Los embriones son colocados en un instrumento tubular denominado catéter. El médico entonces inserta el catéter a través de la vagina y del cuello uterino del progenitor femenino con la finalidad de colocar al embrión directamente en el útero. Para alcanzar el embarazo se requiere la implantación y maduración normal de, al menos, un embrión.

En los casos en los que la fecundación ha sido lograda in vitro, pero después de un número de ciclos, fracasa la implantación en el útero, el médico sugiere la "eclosión asistida," en la que se lisa un pequeño agujero en la zona pelúcida previo a la inserción del embrión en el útero (fig. 21-1B). Este procedimiento asegura que el embrión será capaz de eclosionar de la zona pelúcida en el momento de adherirse al útero.

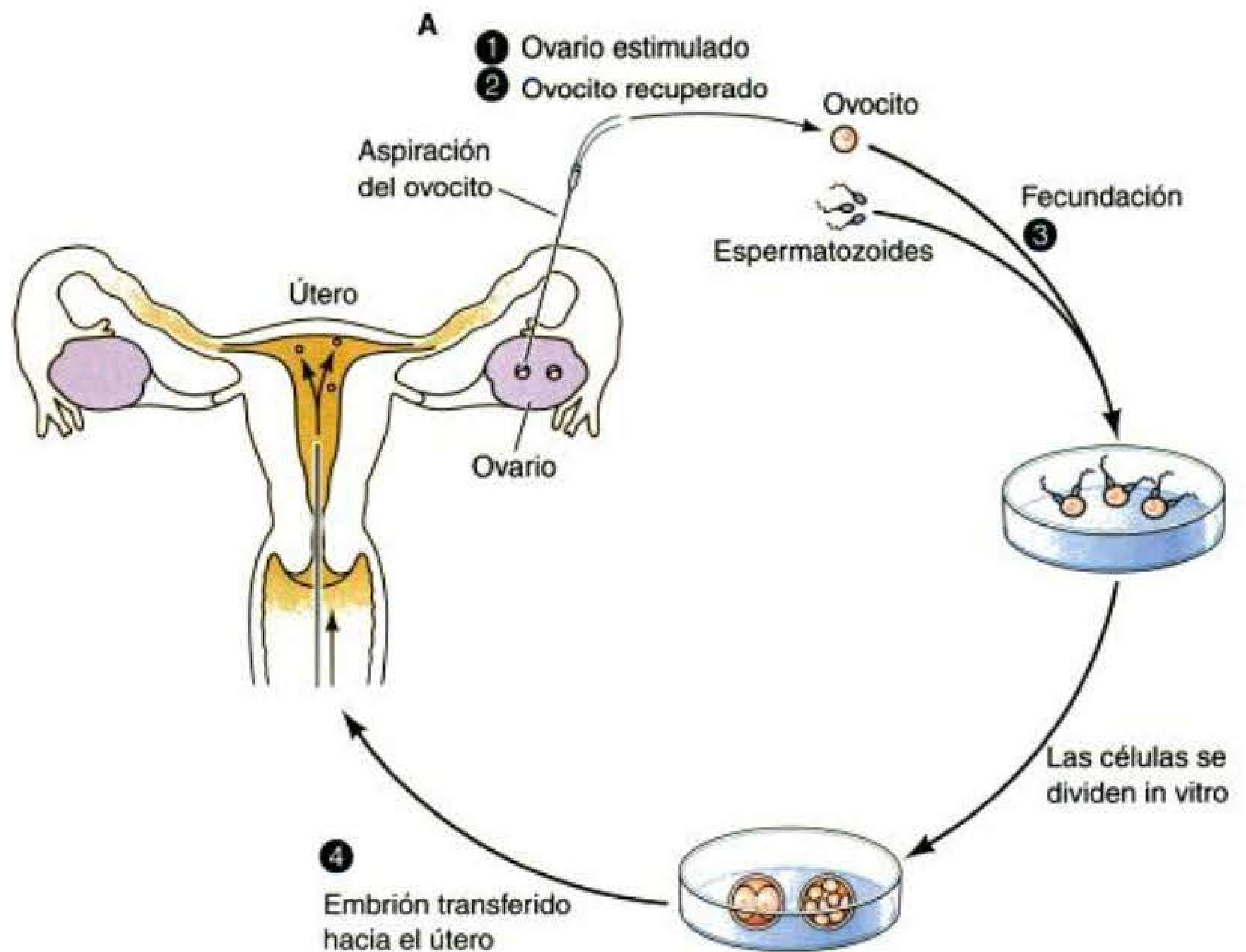
Variaciones de FIV

Además del encuentro del espermatozoide con el ovocito en una placa de Petri llevado a cabo mediante FIV, también son viables otras técnicas. La **inyección intraci-**

toplasmática de espermatozoide (**ICSI**; del inglés, *intracytoplasmatic sperm injection*) fue desarrollada para tratar a parejas que tenían una baja probabilidad de lograr la fecundación debido al número extremadamente bajo de espermatozoides viables normales del progenitor (una condición denominada **oligospermia**). En ICSI, un solo espermatozoide es inyectado en el citoplasma de un ovocito (fig. 21-2). La infertilidad masculina puede ser causada por factores genéticos que llevan a una pobre producción de espermatozoides o por el bloqueo o anomalías de los conductos eyaculadores. Los hombres que han tenido severos daños de sus órganos reproductivos, una vasectomía, o quimioterapia o radiación por cánceres testiculares pueden tener pocos espermatozoides en su eyaculado. Cuando ICSI es combinado con la fecundación in vitro, le permite a estas parejas una probabilidad más favorable de alcanzar la concepción.

La **transferencia intratubaria de gameto**, o **GIFT** (del inglés, *gamete intrafallopian transfer*), fue desarrollada en 1984 como otra variación sobre la fecundación in vitro. Aquí, los espermatozoides son inyectados en la trompa de Falopio en el momento en el que se ovula el ovocito. Esta técnica es utilizada frecuentemente por las parejas con infertilidad inexplicable en la que el progenitor femenino tiene al menos una trompa de Falopio abierta. GIFT es también recomendada para las parejas cuya infertilidad se debe a factores del cuello uterino o inmunitarios que evitan que el espermatozoide alcance el ovocito en la trompa de Falopio. La principal diferencia entre FIV y GIFT es que la fecundación por GIFT se produce naturalmente dentro del cuerpo del progenitor femenino, en lugar de en el laboratorio como en FIV.

La **transferencia intratubaria de cigoto**, o **ZIFT** (del inglés, *zygote intrafallopian transfer*) es otra variación sobre FIV. ZIFT también se denomina **transferencia embrionaria tubaria**. Como en FIV, la fecundación tiene lugar fuera del cuerpo en una placa de petri. Los cigotos resultantes luego son transferidos hacia la trompa de Falopio del progenitor femenino. La localización donde tiene lugar la fecundación y la capacidad del médico para observar y confirmar la fecundación son las principales diferencias entre ZIFT y GIFT. Con GIFT, no se puede observar la fecundación real, debido a que los ovocitos y el espermatozoide se unen dentro de la trompa de Falopio del progenitor femenino.



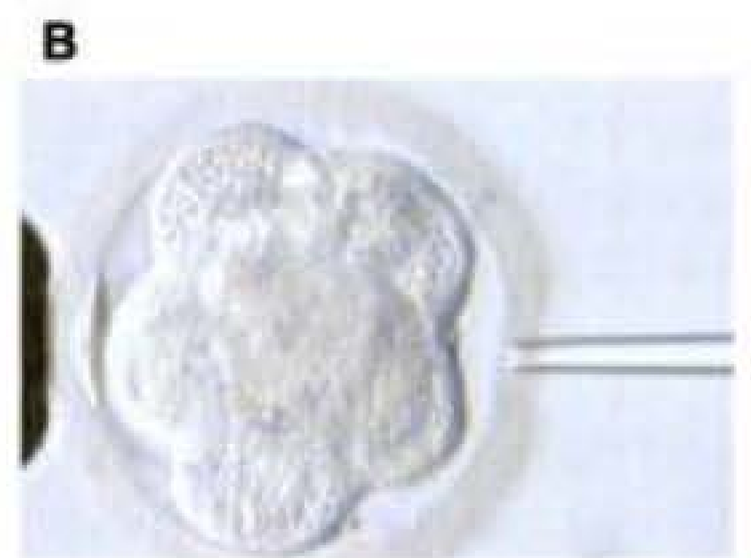


Fig. 21-1. Fecundación in vitro. **A.** El proceso de FIV puede dividirse en cuatro pasos básicos: 1) estimulación del ovario; 2) recuperación del ovocito; 3) fecundación y 4) transferencia del embrión hacia el útero. **B.** La eclosión asistida, por medio de la cual se hace un agujero en la zona pelúcida, es un procedimiento que ayuda a asegurar la implantación del embrión en el útero. (B, fotografía cortesía de The Institute for Reproductive Medicine and Science of St. Barnabas, Livingston, NJ.)

Tasas de éxitos y complicaciones de FIV

El índice de partos de recién nacidos vivos por ovocito recuperado depende de la edad del progenitor femenino. Algunas estadísticas recientes sugieren que aproximada-

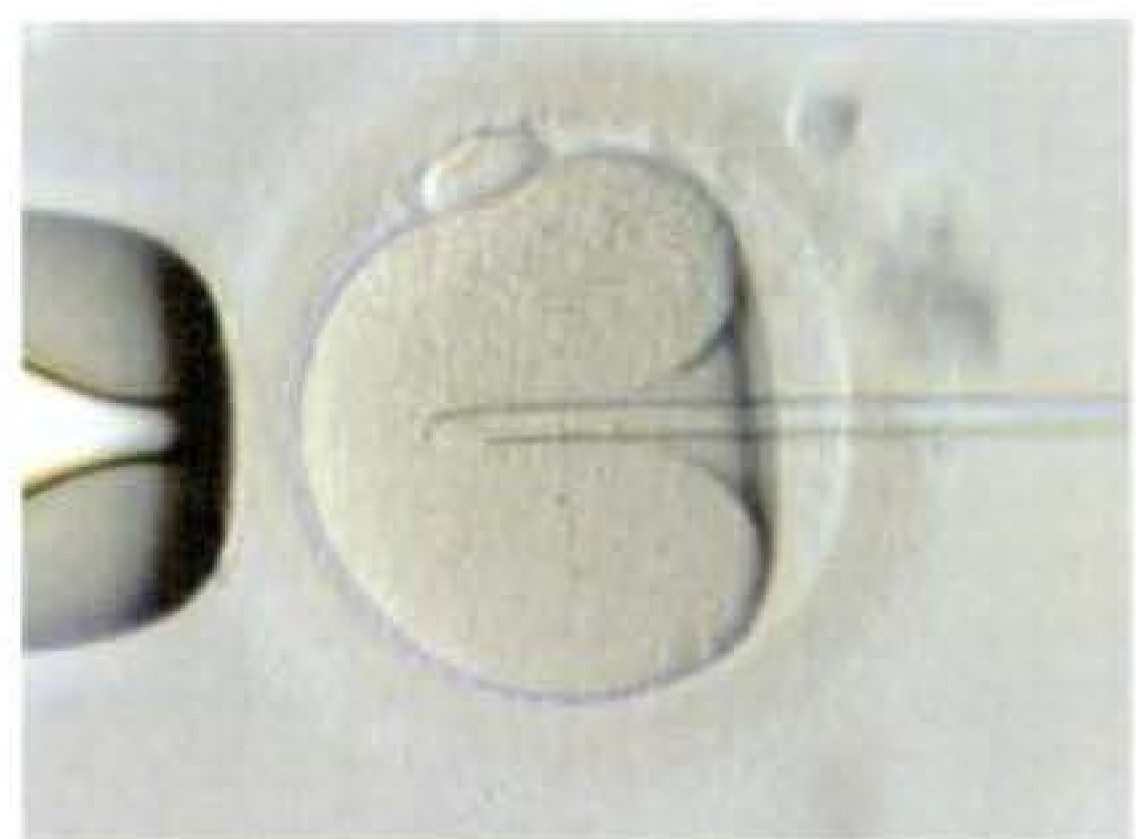


Fig. 21-2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoide. En esta técnica, se inyecta un solo espermatozoide en el citoplasma del ovocito. La pipeta de succión que sostiene al ovocito está sobre la izquierda. La pipeta de inyección (con el espermatozoide) está sobre la derecha. (Fotografía cortesía de The Institute for Reproductive Medicine and Science of St. Barnabas, Livingston, NJ.)

Información adicional y especulaciones

Aspectos éticos y tecnología de asistencia reproductiva

La tecnología de asistencia reproductiva comenzó como un camino para permitir que las parejas infértiles pudiesen lograr el embarazo. Esta técnica ha sido exitosa, ya que los índices de partos son casi iguales a los alcanzados por la fecundación normal. Sin embargo, esta tecnología ha dado lugar a varias inquietudes éticas (y legales) (véase Purdy 2001).

- **¿A quién asiste?** En los Estados Unidos las parejas pueden pagar 10.000 dólares por un ciclo de ICSI. ¿Es la tecnología de asistencia reproductiva solo para los adinerados? Si una mujer con infertilidad sabe que posiblemente puede tener un hijo genéticamente relacionado si ella fuera adinerada, ¿esto no frustra más a una mujer en lugar de ayudarla? ¿Si nuestro objetivo es la curación de la infertilidad, entonces, la atención debería centrarse sobre la medicina medicina de alta tecnología o sobre los esfuerzos de la salud pública para eliminar las enfermedades transmitidas sexualmente (una de las causas importantes de infertilidad)?
- **¿Hay un "derecho" para tener un hijo genéticamente relacionado?** ¿Constituyen el mejor uso de los recursos médicos los procedimientos diseñados para permitir a las mujeres de 50 años tener niños?
- **¿Por qué hay una "necesidad" de tener niños genéticamente relacionados?** ¿Es éste un deseo biológico o está siendo manufacturado por las publicidades hechas por las clínicas de fertilidad que compiten entre sí en el presente mercado?
- **¿Cuál es el la condición jurídica de un embrión congelado?** ¿Es equivalente al aborto tirar a la basura los embriones extra producidos mediante FIV? ¿Quién tiene el derecho de mantener a los embriones si las parejas se divorcian? (¿Y está obligado el padre biológico a hacer aportes de dinero al niño si el embrión está implantado y llega a término?)
- **¿Son seguros para la madre y el recién nacido los actuales procedimientos de tecnología de asistencia reproductiva?** Mientras que la relación entre hormonas y cánceres del aparato reproductor se conoce desde hace años, no se sabe si las mujeres que experimentan extensos ciclos de tecnología de asistencia reproductiva tienen el riesgo de cánceres (véase Pappert 2000.) Se ha informado la elevada incidencia de malformaciones congénitas entre los niños nacidos por tecnología de asistencia reproductivas, pero esto podría ser debido al hecho de que los mismos progenitores tenían problemas (véase Wennerholm y col. 2000).
- **¿Deberían ser reguladas las clínicas de infertilidad?** En contraste con Gran Bretaña, donde hay estrictas leyes que regulan qué pueden hacer las clínicas de infertilidad y cómo deben informar sus resultados, las clínicas de infertilidad en los Estados Unidos no están bajo regulaciones federales o del estado. A menudo es difícil comparar los registros exitosos o los registros de salud entre las clínicas.

mente 31 parejas de cada 100 que intentan una recuperación con FIV alcanzan probablemente el embarazo y el parto. Comparado con la probabilidad 1 en 4 (o 25%) que tienen de alcanzar la concepción en cada ciclo las parejas de salud normal utilizando relaciones sexuales sin protección, FIV ofrece mejores oportunidades de concepción para algunas parejas infértiles. Sin embargo, el índice de éxito desciende a 25,5% para mujeres de 35-37 años de edad y a un 17,1% para mujeres de 38-40. Después de los 40 años de edad, el índice de éxito es menos del 5% (CDC 2002a). Este descenso muy probablemente es debido a la declinación de la calidad de los ovocitos a medida que la mujer avanza en edad.

Aunque el procedimiento de FIV es bastante exitoso para alcanzar el embarazo, éste lleva el riesgo de nacimientos múltiples. Se sabe muy bien que la transferencia de más embriones aumenta las posibilidades de embarazo, pero también aumenta el riesgo de nacimientos múltiples. El índice de nacimientos múltiples depende de la edad de la mujer y del número de embriones transferidos. Cuando fueron transferidos 3 embriones, el porcentaje de nacimiento múltiple fue del 46% para las mujeres en edades entre 20-29. El porcentaje fue solo del 39% para mujeres en edades de 40-44 cuando fueron transferidos 7 o más embriones. El riesgo de nacimientos múltiples es una preocupación muy seria debido a que el nacimiento de múltiples niños predispone a muchos problemas de salud, incluyendo malformaciones, muerte del niño, parto prematuro y bajo peso al nacer (Lipshultz y Adamson 1999; Schieve y col. 1999; Bhattacharya y Templeton 2000; Gleicher y col. 2000). Los niños nacidos prematuramente y con bajo peso al nacer tienen el riesgo de parálisis cerebral y de problemas respiratorios crónicos. Además, las madres que tienen múltiples niños también tienen el riesgo de muchas enfermedades y complicaciones de la salud (p. ej., presión arterial alta, diabetes), y también se incrementa el costo para los embarazos múltiples.

ERRORES GENÉTICOS DEL DESARROLLO HUMANO

Si piensa que es increíble que cualquiera de nosotros pueda sobrevivir para llegar a nacer, está en lo correcto.

Se estima que desde la mitad hasta los dos tercios de todas las concepciones humanas no se desarrollan satisfactoriamente a término (fig. 21-3). Muchos de estos embriones expresan sus anomalías demasiado temprano de modo tal que ellos fracasan en implantarse en el útero. Otros se implantan, pero fracasan en establecer un embarazo exitoso. Por lo tanto, la mayoría de los embriones es abortada espontáneamente, a menudo incluso antes de que la mujer sepa que está embarazada (Boué y col. 1985). Edmonds y col. (1982), utilizando un análisis inmunológico sensible que puede detectar la presencia de gonadotrofina coriónica humana (hCG) tan temprano como a los 8 o 9 días después de la fecundación, monitorearon 112 embarazos en mujeres normales. De estos embarazos determinados por hCG, 67 no pudieron ser mantenidos.

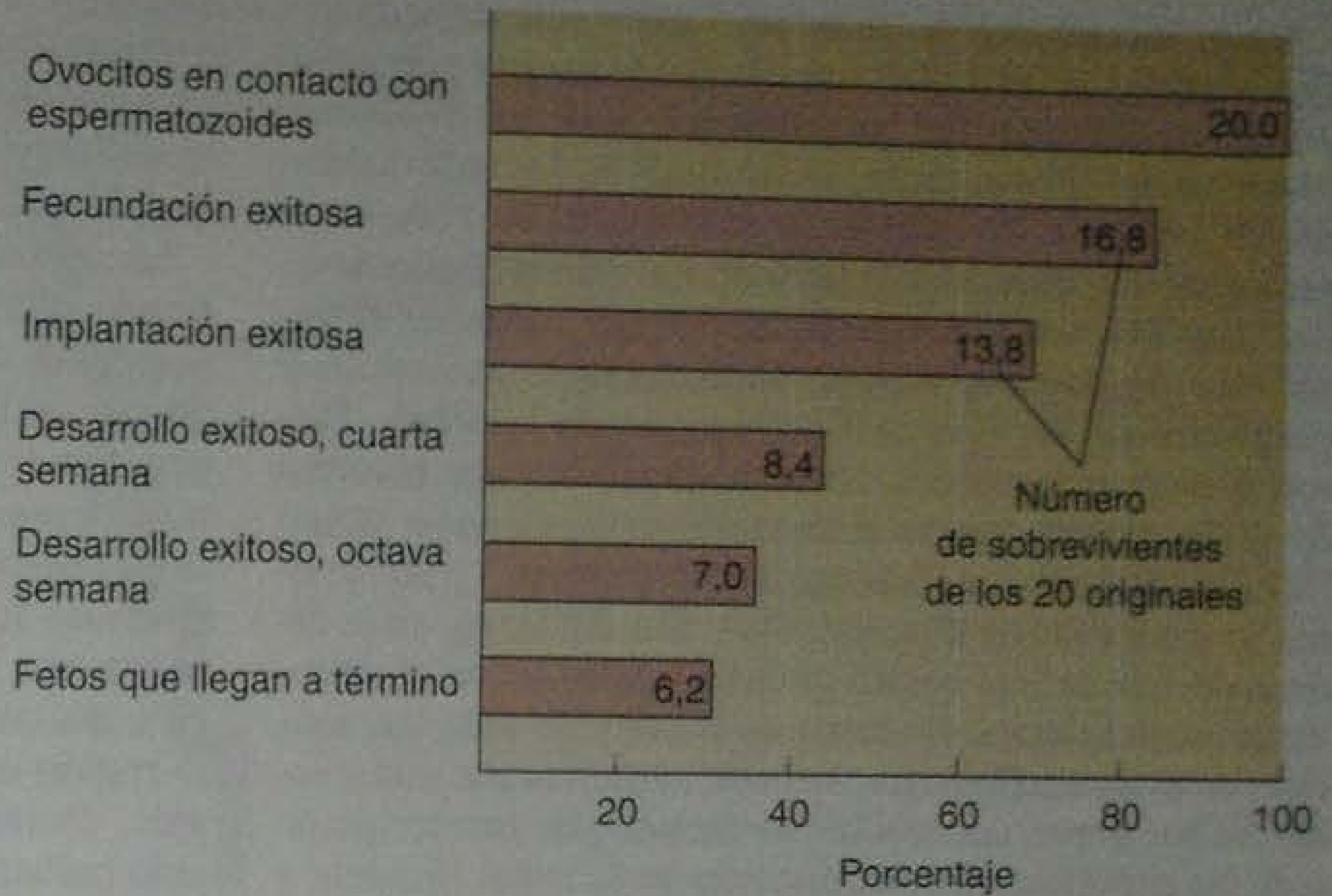


Fig. 21-3. El destino de 20 ovocitos humanos hipotéticos en los Estados Unidos y en Europa del oeste. Bajo condiciones normales, debería esperarse que solo 6,2 o menos de los 20 ovocitos originales se desarrollen exitosamente a término. (Según Volpe 1987.)

Sin embargo, los defectos en los pulmones o en las extremidades no son nocivos para el feto (que no depende de aquellos órganos mientras está dentro de la madre), pero que pueden amenazar la vida una vez que se ha producido el nacimiento. Cerca del 5% de todos los recién nacidos humanos tiene malformaciones reconocibles, algunas de ellas leves, otras muy graves (McKeown 1976).

Las anomalías congénitas ("presentes al nacimiento") y la pérdida de embriones y fetos previa al nacimiento tienen causas intrínsecas y extrínsecas. Las anomalías que son causadas por acontecimientos genéticos (mutaciones, aneuploidías, translocaciones) se denominan **malformaciones** (Opitz y col. 1987). Por ejemplo, la aniridia (ausencia de iris), causada por una mutación del gen *PAX6*, es una malformación. La **trisomía 21** causa graves malformaciones (la mayoría de ellas es menor, tales como cambios del músculo facial, pero algunas de ellas son graves, tales como las anomalías cardíacas, las anomalías intestinales y los problemas cognoscitivos), colectivamente denominadas **síndrome de Down** (fig. 21-4). Se piensa que ciertos genes sobre el cromosoma 21 codifican para factores de transcripción y la copia extra del cromosoma 21 probablemente causa una sobreproducción de estas proteínas regulatorias. Tal sobreproducción debería causar la alteración de la regulación de los genes necesarios para la formación del corazón, del músculo y del tejido nervioso (Nishigaki y col. 2002).

La mayor parte de los fallecimientos embrionarios y fetales son probablemente debidos a anomalías cromosómicas que interfieren con el proceso de desarrollo normal. Tanto como el 50% de los ovocitos humanos tiene anomalías cromosómicas que pueden resultar en fetos no viables (Opitz 1987). Incluso una copia extra extremadamente pequeña de cromosoma 21 causa la regulación alterada de numerosas funciones del desarrollo. En efecto, las personas con síndrome de Down son algunas de las únicas personas con trisomías autosómicas que sobreviven más allá de las primeras semanas de la infancia (y con frecuencia alcanzan la edad adulta). Las personas con las trisomías 13 y 18 (síndrome de Patau y síndrome de Edward, respectivamente) a veces pueden vivir por años con el cuidado médico apropiado.



Fig. 21-4. Síndrome de Down. **A.** El síndrome de Down, causado por una tercera copia del cromosoma 21, está caracterizado por patrón facial particular y por retardo mental, la ausencia de hueso nasal, y defectos frecuentes cardíacos y gastrointestinales. **B.** El procedimiento mostrado aquí investiga el número de cromosomas utilizando sondas marcadas de manera fluorescente que se unen al DNA sobre los cromosomas 21 (rosa) y 13 (azul). Esta persona tiene síndrome de Down (trisomía 21), pero las dos copias normales del cromosoma 13. (A, fotografía ©Laura Dwight/Corbis; B, fotografía cortesía de Vysis, Inc.)

Hasta recientemente, el estudio molecular de la genética humana se centraba casi exclusivamente sobre los errores congénitos del metabolismo y de las proteínas estructurales. Por lo tanto, predominaban las enfermedades de enzimas, de colágenos y de globinas. Pero estas proteínas son el producto final de las células diferenciadas. Los errores en las proteínas involucradas en el desarrollo –factores de transcripción, factores paracrinos y elementos de las vías de transducción de la señal– fueron poco comprendidos. Las enfermedades que resultan de tales errores fueron a menudo categorizadas como "malformaciones" o "anomalías congénitas," y sus causas se mantuvieron desconocidas. Sin embargo, en la última década se han hecho grandes adelantos en el conocimiento del desarrollo humano y ahora se sabe que muchas de estas malformaciones son causadas por mutaciones de los genes que codifican factores de transcripción y de las proteínas de transducción de la señal (Epstein y col. 2003).

Identificación de genes de las anomalías del desarrollo humano

No se puede experimentar sobre embriones humanos, ni se pueden reproducir selectivamente a humanos para expresar un fenotipo mutante particular. ¿Entonces, cómo se pueden encontrar los genes que están involucrados en el desarrollo humano normal y aquellas mutaciones que causan malformaciones? Dos técnicas han revolucionado la embriología humana dentro de la década pasada.

La primera técnica es la **clonación génica posicional** (o **clonado posicional**) (Collins 1992; Scambler 1997). Aquí, el análisis de ligamiento (linaje) resalta una región del genoma donde se piensa que reside un gen mutante particular. Mediante la clonación de secuencias superpuestas de esta región para producir un mapa de DNA, los investigadores pueden esperar encontrar una región de DNA que difiere entre las personas que tienen la malformación y las personas que carecen de ella. Entonces, mediante la secuenciación de esta región del genoma, el gen puede ser localizado.

Como un ejemplo, se analizará el descubrimiento del gen humano *Aniridia*, cuya ausencia causa defectos en el desarrollo normal del ojo. Las personas heterocigotas para este gen tienen poco o nada de iris en sus ojos. Los ratones tienen un fenotipo semejante, los ratones homocigotos para esta afección nacen muertos y no tienen ojos ni nariz. Utilizando DNA de personas con aniridia, Ton y col. (1991) encontraron una región del cromosoma 11 que estaba presente en los individuos no afectados, pero completa o parcialmente ausente en los individuos con aniridia. Además, esta región del DNA contenía una región que podía ser un gen (es decir, ésta tenía un sitio promotor así como secuencias que implican intrones y exones). Para determinar si esta región era un gen que era activo en el desarrollo del ojo, ellos hicieron un Northern blot y una hibridación in situ, utilizando esta región del DNA como una sonda. Como muestra la figura 4-13F, esta sonda encuentra mRNA complementario primariamente en las regiones corporales de los tejidos del cerebro y del ojo. Por lo tanto, este fragmento de DNA contenía un gen que era verdaderamente expresado en el cerebro y en el ojo. La secuenciación de este fragmento demostró que éste era el gen *PAX6* humano: el homólogo humano del gen *Pax6* ya conocido en los ratones. Este hallazgo fue confirmado mediante hibridación in situ (fig. 21-5).

La aproximación de clonado génico posicional está siendo utilizada actualmente para mapear los genes responsables de las anomalías congénitas vistas en el síndrome de Down. El síndrome de Down es la alteración genética más frecuente en humanos y, como se mencionó anteriormente, es causada, en general, por una copia extra completa del cromosoma 21. Sin embargo, hay casos poco frecuentes de síndrome de Down en los cuales solamente está presente en tres copias una pequeña región del cromosoma 21. Esta región ha sido denominada la **región crítica del síndrome de Down** (DSCR; del inglés, *Down syndrome critical region*). Un gen que ha sido hallado en esta región es el gen *DSCR1*. Éste se expresa predominantemente en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético. Estudios recientes (Fuentes y col. 2000; Ermak y col. 2002) han demostrado que éste es sobreexpresado en las personas con síndrome de Down y que estas personas codifican una proteína que inhibe a la calcineurina, una de las principales proteínas reguladoras del calcio.*

La segunda técnica es el **mapeo del gen candidato**. Esta aproximación es similar al clonado génico posicional, pero aquí, se comienza con una correlación entre el mapeo genético de un síndrome particular y un gen asociado con un fenotipo similar en otras especies. Como un ejemplo, se tomará otra afección que produce ojos pequeños: el síndrome de Waardenburg tipo 2. Esta afección autosómica dominante está caracterizada por sordera, iris heterocromáticos (multicoloreados) y un mechón blanco en la frente (fig. 21-6A). Mediante el análisis de linajes de varias familias cuyos miembros tenían esta condición, Hughes y col. (1994) demostraron que es causada por una mutación en un gen sobre el brazo corto del cromosoma 3, entre las bandas 12.3 y 14.4. Una condición estrictamente similar se encuentra en los ratones, en los que se denomina microftalmia. Las mutaciones del gen *microphthalmia* (*Mitf*) causan un síndrome dominante que involucra sordera, un parche de pelaje blanco y anomalías del ojo (fig. 21-6B). ¿Puede el síndrome de Waardenburg tipo 2 ser causado por mutaciones en el equivalente humano del gen *Mitf* de ratón? El gen *Mitf* de ratón fue clonado y se encontró (mediante secuenciación e hibridación in situ) que codificaba una proteína de unión al DNA que se expresa en las células pigmentarias de los ojos, los oídos y los folículos pilosos de los ratones embrionarios (Hemesath y col. 1994; Hodgkinson y col. 1994; Nakayama y col. 1998). Por lo tanto, la versión humana de *Mitf* es un gen candidato para este síndrome.

El gen *Mitf* de ratón fue luego utilizado para hacer una sonda para buscar genes similares en el genoma humano. La sonda halló un homólogo humano del gen *microphthalmia* y esta secuencia (*MITF*) fue mapeada exactamente en la misma región del cromosoma 3 como en el sín-

* Curiosamente, la sobreproducción de DSCR1 en adultos ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer (Ermak y col. 2001).

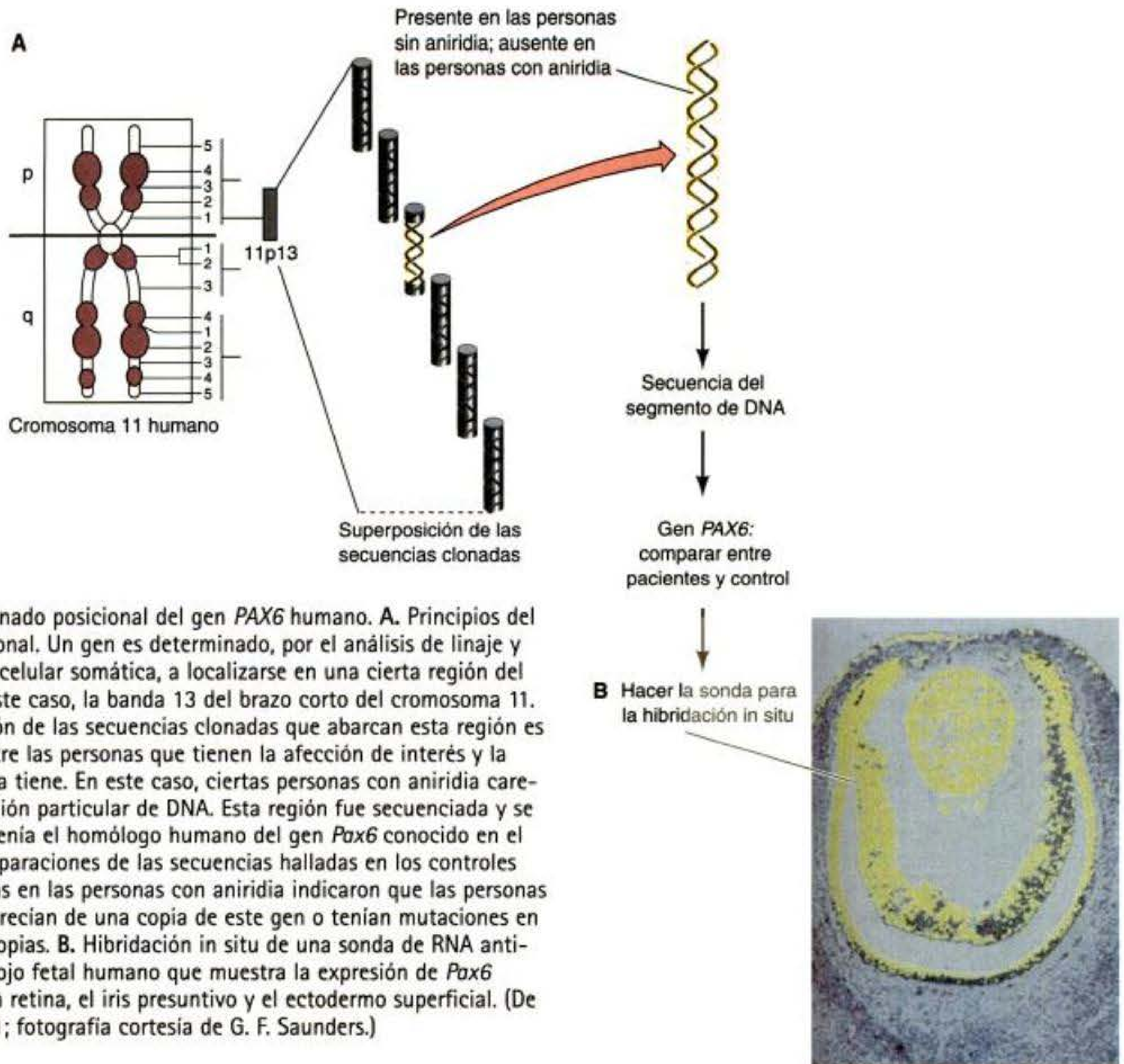


Fig. 21-5. Clonado posicional del gen *PAX6* humano. **A.** Principios del clonado posicional. Un gen es determinado, por el análisis de linaje y de la genética celular somática, a localizarse en una cierta región del genoma –en este caso, la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11. La superposición de las secuencias clonadas que abarcan esta región es comparada entre las personas que tienen la afección de interés y la gente que no la tiene. En este caso, ciertas personas con aniridia carecen de una región particular de DNA. Esta región fue secuenciada y se halló que contenía el homólogo humano del gen *Pax6* conocido en el ratón. Las comparaciones de las secuencias halladas en los controles con las halladas en las personas con aniridia indicaron que las personas con aniridia carecían de una copia de este gen o tenían mutaciones en una de estas copias. **B.** Hibridación in situ de una sonda de RNA antisentido en un ojo fetal humano que muestra la expresión de *Pax6* (amarillo) en la retina, el iris presuntivo y el ectodermo superficial. (De Ton y col. 1991; fotografía cortesía de G. F. Saunders.)

drome de Waardenburg tipo 2 (Tachibana y col. 1994; Tassabehji y col. 1994). Cuando las personas con síndrome de Waardenburg fueron estudiadas, se halló que cada una de ellas tenía mutaciones del gen *MITF*. Por lo tanto, el síndrome de Waardenburg tipo 2 fue correlacionado con mutaciones sobre una proteína de unión al DNA codificada por el locus *MITF* humano.

Recientemente, el mapeo del gen candidato ha sido complementado con datos de la biología del desarrollo. Por ejemplo, el fenotipo de los knockouts del gen *sonic hedgehog* del ratón se asemeja al de los humanos con holoprosencefalia (ciclopia; véase fig. 6-26). Este hallazgo hace a *sonic hedgehog* un gen candidato para la holoprosencefalia. Mediante la búsqueda para el gen *sonic hedgehog*, se determinó que varias familias (pero no todas) con holoprosencefalia tenían mutaciones en este gen (Nanni y col. 1999; Odent y col. 1999).

SITIO WEB 21.1 **Embriología y genética humana (Human embriology and genetics).** Este sitio web conecta con tutoriales sobre el desarrollo humano así como lo hace con el sitio de la herencia mendeliana en el hombre (OMIM), en la que se detallan todas las afecciones genéticas humanas.

La naturaleza de los síndromes humanos

Como se ha visto, los niños humanos a veces nacen con malformaciones, que varían desde amenazantes para la vida hasta relativamente benignas. Con frecuencia estas malformaciones están asociadas con síndromes (véase cap. 1) y por esta razón muestran pleiotropía.

Pleiotropía

La producción de varios efectos por un gen o pares de genes se denomina **pleiotropía** (fig. 21-7). Por ejemplo, el síndrome de Waardenburg tipo 2, como se mencionó antes, involucra defectos en el iris, anomalías de la pigmentación, sordera e incapacidad para producir un número normal de mastocitos (o células cebadas). El pigmento de la piel, el iris del ojo, el tejido del oído interno y los mastocitos no están relacionados entre sí, de manera que la ausencia de uno debería producir la ausencia de los otros. En su lugar, estas cuatro partes del cuerpo utilizan de manera independiente la proteína MITF como un factor de transcripción. Este tipo de pleiotropía ha sido denominada **pleiotropía en mosaico**

El segundo mecanismo de dominancia son las **mutaciones de ganancia de función**. Por lo tanto, la displasia tanatofórica (así como formas más leves de enanismo, como acondroplasia) resultan de mutaciones en el gen *FGFR3* que lleva a un receptor FGF 3 mutante a estar constitutivamente activo (en lugar de ser activado solamente por FGF; véase cap. 6). Esta actividad es suficiente para provocar la diferenciación prematura y la muerte del cartílago en las placas de crecimiento de los huesos largos, llevando al acortamiento de estos huesos.

El tercer mecanismo de dominancia es un **alelo dominante negativo**. Cuando la forma activa de la proteína está formada por múltiples subunidades, todas las subunidades tienen que ser de tipo salvaje para que la proteína funcione. En tales casos, una mutación en solo uno de los alelos –el alelo dominante negativo– puede producir la proteína no funcional. Un alelo dominante negativo no es simplemente no funcional; éste es perjudicial. Un alelo dominante negativo es la causa del **síndrome de Marfan**, un trastorno de la matriz extracelular. El síndrome de Marfan da como resultado anomalías de las articulaciones y del tejido conectivo, de las cuales no todas son necesariamente desventajosas. Las características de este síndrome son el incremento de la altura, extremidades y dígitos desproporcionadamente largos, y laxitud de las articulaciones leve a moderada. Sin embargo, los pacientes con síndrome de Marfan también pueden experimentar deformidades de la columna vertebral, miopía y cristalino suelto o dislocado, y (lo más importante) problemas aórticos que pueden llevar a aneurisma (rotura de la aorta) tardíamente en la vida. Las mutaciones son el gen que codifica fibrilina, una glucoproteína secretada que forma microfibrillas multiméricas en el tejido conectivo elástico. La presencia de incluso pequeñas cantidades de fibrilina mutante impide la asociación de la fibrilina tipo salvaje en microfibrillas. Eldadah y col. (1995) han demostrado que cuando un gen humano mutante para fibrilina es transfectado en una célula fibroblástica que ya contenía dos genes tipo salvaje, se inhibe la incorporación de fibrilina hacia la matriz extracelular.

Se están comenzando a entender las bases moleculares para muchos de los síndromes de malformaciones heredadas en seres humanos. Esta comprensión constituye una síntesis de importancia fundamental de la biología del desarrollo, de la genética médica* y de la medicina pediátrica.

Expresión génica y enfermedad humana

Las técnicas de mapeo del gen candidato y el clonado génico posicional han acercado a la embriología médica y a la genética médica. Esta fusión ha permitido a los científicos y médicos entender el desarrollo humano normal así como también las causas de muchas malformaciones. Como debería esperarse, las alteraciones en la expresión génica pueden producirse a niveles de la transcripción, del procesamiento del RNA, de la traducción y de la modificación postraduccional.

Errores congénitos en la regulación de la transcripción

El grupo de genes mejor estudiados son aquellos genes involucrados en la regulación de la transcripción. Estos genes incluyen a los que codifican los factores de transcripción y los componentes de las cascadas de transducción de la señal. Muchos de estos genes son mencionados en el cuadro 21-1 y varios de ellos (p. ej., *PAX6*, *MITF*) ya han sido discutidos.

Errores congénitos del procesamiento del RNA nuclear

Se estima que al menos el 35% de los genes humanos produce RNA que pueden ser empalmados alternativamente (Croft y col. 2000). Por lo tanto, aun cuando el genoma puede contener solo 35.000-80.000 genes, su **proteoma** (que abarca a todas las proteínas codificadas por el genoma) es probablemente mucho más complejo.

MUTACIONES EN SITIOS DE EMPALME. Un gen que tiene un destacado patrón de empalme es *Dscam* (véase cap. 5). La abreviatura del gen se adopta por "*m*olécula de *a*dhesión *c*elular del *s*índrome de *D*own" (del inglés, *Down syndrome cell adhesión molecule*), y está localizado en la región del cromosoma 21 asociada con los síntomas neurológicos del síndrome de Down. *Dscam* de mamíferos se expresa abundantemente en el sistema nervioso durante el desarrollo, especialmente en los procesos axonales y dendríticos dentro del cerebelo, el hipocampo y el bulbo olfatorio. La proteína Dscam está involucrada muy probablemente en las interacciones célula-célula durante el desarrollo axonal-dendrítico y en el mantenimiento de las redes neuronales funcionales. Parece haber varias isoformas de esta proteína que se expresan en diferentes subgrupos de neuronas (Yamakawa y col. 1998; Barlow y col. 2001).

Las mutaciones en los sitios de empalme de los genes pueden impedir que se originen ciertas isoformas de proteínas. Se estima que el 15% de las mutaciones puntuales que resultan en enfermedades genéticas humanas crean tales anomalías de sitios de empalme (Krawczak y col. 1992; Cooper y Mattox 1997). Una de estas enfermedades es la hiperplasia suprarrenal congénita. Este síndrome es causado frecuentemente por la ausencia de un gen funcional para la 21-esteroide hidroxilasa (*CYP21*). Ante la ausencia de esta enzima, los esteroides que normalmente deberían ser utilizados para producir cortisol son desviados hacia la producción de más testosterona. El resultado es que las niñas con esta condición son fenotípicamente masculinizadas. En muchos ejemplos, las personas con esta condición tienen una mutación puntual en el sitio de empalme para el segundo intrón del gen *CYP21*. Esta mutación evita que el intrón sea saltado y produce una enzima defectuosa. Las mutaciones que crean nuevos sitios de empalme o impiden el uso de los ya existen-

* Aunque hay una superposición significativa entre las disciplinas, la *genética humana* es el estudio de la variabilidad humana, mientras que la *genética médica* es el estudio de la variabilidad humana anormal. La *genética clínica* es la especialidad médica que asiste a los individuos con variabilidad anormal, y el *consejero genético* es la profesión que soporta en todos los sentidos los papeles de los genetistas clínicos, y las necesidades de los pacientes y de sus familias (J. M. Optiz, comunicación personal.)

Cuadro 21-1 *Algunos genes que codifican factores de transcripción humanos y los fenotipos que resultan de sus mutaciones*

Gen	*Fenotipo de la mutación*
Receptor de andrógeno	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos (capítulo 20)
AZF1	Azoospermia
CBFA1	Displasia cleidocraneal (capítulo 15)
CSX	Defectos cardíacos
EMX2	Esquizencefalia (capítulo 23)
Receptor de estrógeno	Problemas de regulación del crecimiento, esterilidad (capítulo 15)
Forkhead-like 15	Agenesia de tiroides, fisura de paladar
GLI3	Síndrome de Grieg (capítulo 16)
HOXA-13	Síndrome mano-pie-genital (capítulo 16)
HOXD-13	Polisindactilia (capítulo 16)
LMX1B	Síndrome uña-rótula (capítulo 16)
MITF	Síndrome de Waardenburg tipo 2 (capítulos 5, 21)
PAX2	Síndrome coloboma-renal (capítulo 15)
PAX3	Síndrome de Waardenburg tipo 1 (capítulo 12)
PAX6	Aniridia (capítulos 5, 21)
PTX2	Síndrome de Reiger (capítulo 11)
PITX3	Cataratas congénitas
POU3F4	Sordera y distonía
SOX9	Displasia campomélica, inversión sexual cromosómica (capítulos 15, 20)
SRY	Inversión sexual cromosómica (capítulo 20)
TBX3	Síndrome de Schinzel (síndrome cúbito-mamario)
TBX5	Síndrome de Holt-Oram (capítulo 16)
TCOF	Síndrome de Treacher-Collins
TWIST	Síndrome de Seathre-Chotzen
WT1	Anomalías urogenitales (capítulo 15)

tes también resultan en proteínas no funcionales (Hutchinson y col. 2001).

MUTACIONES EN LOS FACTORES QUE EMPALMAN. Hay algunas proteínas y RNA pequeños nucleares que son utilizados en todo el cuerpo para efectuar empalme diferencial del pre-mRNA, y hay algunas proteínas que parecen regular el empalme diferencial de un modo característico de un tipo celular particular. Si se mutan los genes que codifican estos factores de empalme específicos de tipo celular, se puede esperar que varias isoformas específicas de tipo celular sean aberrantes. Éste parece ser el caso en una de las causas más importante de la mortalidad infantil hereditaria, la atrofia muscular espinal. Aquí, las mutaciones en el gen que codifica la proteína SMN (supervivencia de las motoneuronas) impide el mantenimiento de las neuronas motoras. Esta proteína está involucrada en el empalme de nRNA en este subgrupo de neuronas (Pellizzoni y col. 1999).

Errores congénitos de traducción

Muchas enfermedades genéticas son debidas a mutaciones que crean codones de terminación de la traducción. Por ejemplo, el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (véase fig. 17-12) puede ser causado por una transición de guanina a adenina en el nucleótido 2682 del gen que codifica el receptor de andrógeno. Esta mutación cambia la codificación del codón 717 (en el medio del mensajero) de triptófano a codón de terminación de la traducción (Sai y col. 1990). Este receptor truncado de este modo carece de la mayor parte de su dominio de unión al andrógeno.

Otras mutaciones pueden alterar la longevidad de un mRNA, que puede afectar ampliamente el número de moléculas de proteínas sintetizadas por éste. Por ejemplo, la ***hemoglobina Constant Spring*** una mutación que se produce naturalmente en la que el codón de terminación de la traducción del gen de la a-globina ha sido mutado hacia un codón de aminoácido y la traducción continúa por 31 codones más (Wang y col. 1995). Esta mutación da como resultado la desestabilización del mRNA de la α-globina, causando una reducción de más del 95% en la expresión del gen de la α-globina de los locus afectados. La enfermedad clínica resultante es uno de los tipos de **α-talasemias**.

En numerosos ejemplos, ciertas proteínas son utilizadas para estabilizar RNA mensajeros particulares o para llevarlos a los ribosomas. La forma más frecuente de retardo mental heredado, el **síndrome del X frágil**, puede resultar de una mutación en un gen cuyo producto es crítico para la traducción de ciertos mensajeros específicos del tejido nervioso. El síndrome del X frágil es causado frecuentemente por la expansión e hipermetilación de CGG repetidas en la región 5´ sin traducir del gen *FMR1*. Mientras que la mayor parte de los individuos tienen alelos *FMR1* que contienen de 6 a 50 CGG repetidas, las personas con síndrome del X frágil tienen alelos con más de 200 de tales repeticiones (fig. 21-9). Esta expansión CGG bloquea la transcripción de este gen. El gen *FMR1* codifica una proteína de unión al RNA que parece ser crítica para la *traducción* de ciertos mensajeros. Normalmente, cerca del 85% de la molécula de la proteína FMR1 está asociada con polisomas que están traduciendo. Las proteínas FMR1 con mutaciones en los dominios de unión al RNA no se observan con polisomas citoplasmáticos y tales mutaciones producen formas graves del síndrome del X frágil (Feng y col. 1997a,b). Estudios recientes (Brown y col. 2001; Darnell y col. 2001) han demostrado que un subgrupo particular de RNA mensajero del cerebro de ratón requiere la proteína FMR1 para la adecuada traducción. La mayor parte de estos mensajeros está involucrada con funciones sinápticas o desarrollo neuronal. Es probable que FMR1 una a mRNA específicos, regulando su traducción o dirigiéndolas hacia la dendrita donde pueden esperar la señal para la traducción.

A



B

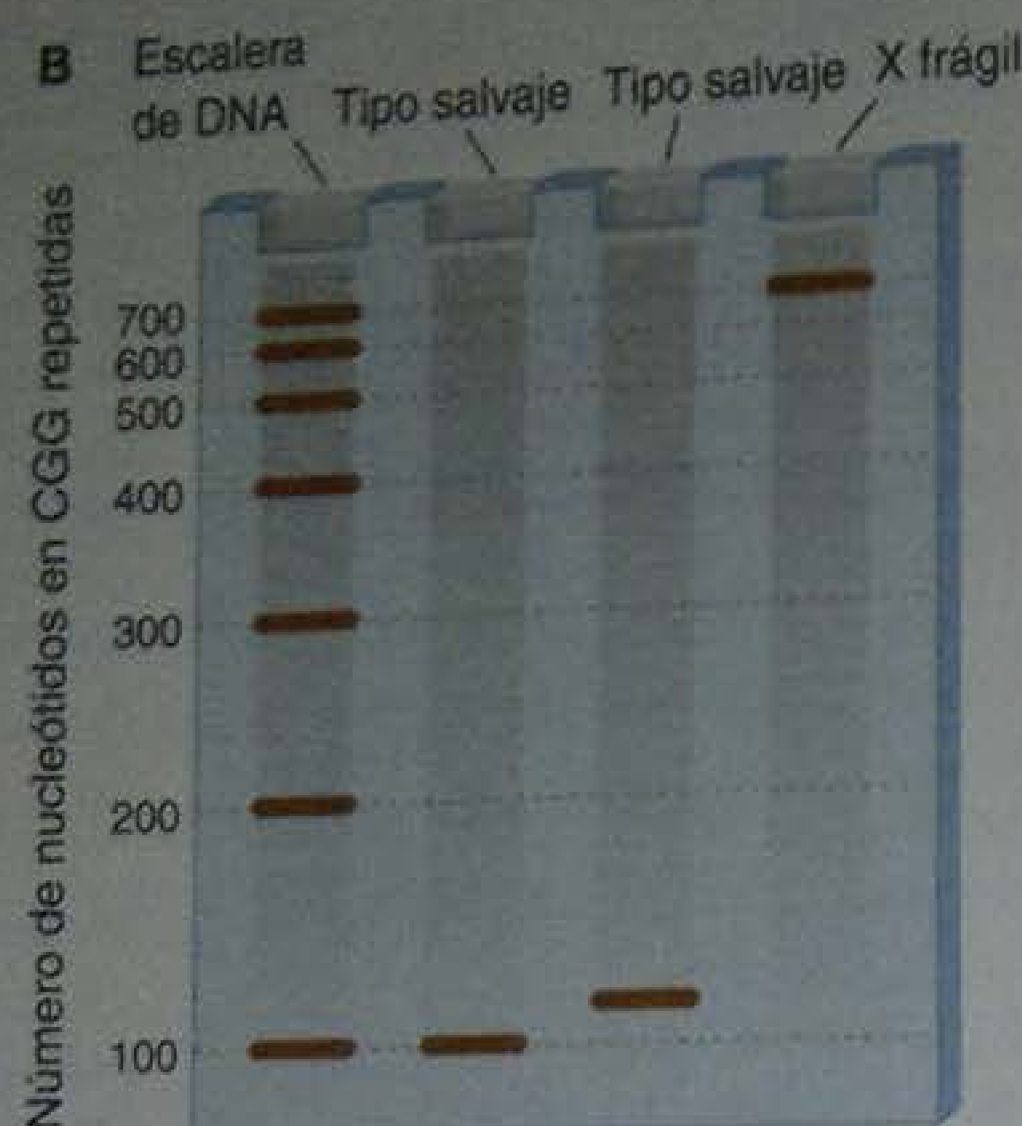


Fig. 21-9. Síndrome del X frágil. **A.** Varón de 26 años con síndrome del X frágil. Los individuos afectados frecuentemente tienen una cabeza de gran tamaño con frente, orejas y maxilares relativamente grandes. **B.** El número de CGG repetidas es crítico para determinar si el gen *FMR1* es transcrito en el sistema nervioso. Este número puede ser determinado por la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR generalmente revela 6-50 CGG repetidas en el gen *FMR1*. Sin embargo, en las personas con síndrome del X frágil, se observan cerca de 200 repeticiones. El producto de este gen parece ser necesario para la traducción de ciertos mensajeros neuronales; sin éste, estos mensajes no son llevados a los ribosomas. (A, fotografía de De Boulle y col. 1993.)

Genética de la preimplantación

Amniocentesis, muestra de vellosidades coriónicas y genética de la preimplantación

Una de las consecuencias de la fecundación in vitro y de la capacidad para detectar mutaciones genéticas temprano en el desarrollo es una nueva área de la medicina denominada **genética de la preimplantación**. La genética de la preimplantación busca hacer análisis para las enfermedades genéticas *antes* de que el embrión ingrese al útero.

Muchas de las enfermedades genéticas pueden ser diagnosticadas antes de producirse el nacimiento. Este **diagnóstico prenatal** puede hacerse mediante muestra de vellosidades coriónicas a las 8-10 semanas de gestación o mediante amniocentesis alrededor del cuarto o quinto mes de embarazo. **La muestra de vellosidades coriónicas** implica tomar una muestra de la placenta, mientras que la **amniocentesis** implica tomar una muestra de líquido amniótico. En ambos casos, se puede hacer crecer a las células fetales desde la muestra y luego ser analizadas para la presencia o ausencia de ciertos cromosomas, genes o enzimas. Sin embargo, aunque la utilidad de estos procedimientos ha sido la detección de enfermedades genéticas, ha traído con ellos muchas inquietudes éticas. En primer lugar, si se encuentra que el feto tiene un enfermedad genética, el único medio de evitarla es abortando el embarazo. En segundo lugar, el tiempo de espera entre el conocimiento que está embarazada y los resultados de la amniocentesis o de la muestra de vellosidad coriónica pueden crear un "embarazo provisorio." Muchas parejas no anuncian su embarazo durante este período de mucho estrés por miedo a que pudiera tener que ser terminado (Rothman y col. 1995).

Un modo de resolver este problema es someter a análisis a las células embrionarias antes de que el embrión esté incluso implantado en el útero. La genética de la preimplantación es llevada a cabo sobre embriones generados por fecundación in vitro. Mientras que los embriones están todavía en la placa de Petri, en el estadio de 6-8 células, se hace un pequeño orificio en la zona pelúcida y se extirpan dos blastómeras del embrión (fig. 21-10). Debido a que el ovocito de mamíferos experimenta desarrollo regulativo, su extirpación no pone en peligro al embrión. Las blastómeras aisladas pueden luego ser analizadas inmediatamente. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa permite que sea determinada la presencia o ausencia de ciertos genes y la **hibridación in situ por fluorescencia (FISH)** puede ser utilizada para determinar si están presentes los números y los tipos de cromosomas normales (Kanavakis y Traeger-Synodinos 2002; Miny y col. 2002). Los resultados están disponibles generalmente dentro de los 2 días. Los presuntivos embriones tipo salvaje pueden ser implantados en el útero, mientras que los presuntivos embriones mutantes son descartados. Para muchas parejas, es más fácil considerar la implantación de solo los embriones que son probablemente más sanos que abortar los fetos que más probablemente producen niños malformados o no viables.



Fig. 21-10. La genética de preimplantación es llevada a cabo sobre una de dos blastómeras (vistas aquí en la pipeta) tomadas desde un blastocisto temprano. La reacción en cadena de la polimerasa es entonces utilizada para determinar si ciertos genes en estas células están presentes, ausentes o mutados. (Fotografía cortesía de The Intitute for Reproductive Medicine and Science of St. Barnabas, Livingston, NJ.)

SITIO WEB 21.3 **Bioética: ¿qué es "normal"? (Bioethics: What is "normal?").** La capacidad para diagnosticar prenatalmente enfermedades genéticas ha permitido la ter-

minación selectiva del embarazo si el feto es anormal. Sin embargo, mientras que ciertas enfermedades producen nacidos muertos y nacidos vivos que mueren poco después del parto, otras enfermedades no son amenazas para la vida. Esto crea dilemas morales sobre si se debe continuar el embarazo.

Separación de espermatozoides y selección sexual

La genética de la preimplantación, mientras se están salvando los problemas éticos de la amniocentesis y de la muestra de vellosidades coriónicas, da origen a cuestiones éticas por sí misma. Los mismos procedimientos que permiten la genética de la preimplantación también posibilitan a los médicos conocer el sexo del embrión. A veces, los padres desean tener esta información; a veces, no. Sin embargo, el conocimiento del sexo de un embrión antes de la implantación origina la posibilidad de que los padres puedan decidir el sexo de sus hijos e implantar solo embriones del sexo deseado. Diferentes países e incluso diferentes hospitales tienen distintas políticas sobre si se permite el diagnóstico de preimplantación solamente con el objetivo de la determinación sexual.

Otro modo para llevar a cabo la selección sexual es a través de la selección del espermatozoide. El cromosoma X es sustancialmente más grande que el cromosoma Y; por esta razón, los espermatozoides humanos que contienen un cromosoma X contienen cerca del 3% más del total del DNA que los espermatozoides que contienen un cromosoma Y. Esta diferencia de DNA puede ser medida y los espermatozoides que llevan el X– y los que llevan el Y– son separados sobre la base de sus proporción tamaño/masa, utilizando un citómetro de flujo. Los espermatozoides separados pueden entonces ser utilizados para inseminación artificial (o fecundación in vitro). Estudios recientes han demostrado que esta técnica es fiable en un 90% para la separación de los espermatozoides que llevan la X y confiable en casi un 78% para la separación de los espermatozoides que llevan el Y (Stern y col. 2002).

La selección sexual se observa como un medio de evitar las enfermedades ligadas al X, pero ha sido utilizada primariamente como un método de equilibrio familiar. Los que se oponen a la selección sexual señalan que puede ser usada para impedir el nacimiento de niñas en culturas donde las mujeres no son tan valoradas como el hombre.

SITIO WEB 21.4 **Bioética: selección sexual (Bioethics: Sex selection).** La selección sexual puede ser utilizada como una forma de ingeniería social. ¿Es moral seleccionar el sexo de su hijo? Bajo algunas circunstancias, ¿es moral no hacerlo?

TERATOGÉNESIS: AGRESIONES AMBIENTALES SOBRE EL DESARROLLO HUMANO

Además de las mutaciones genéticas que pueden afectar el desarrollo, se conocen numerosos factores ambientales que pueden alterar el desarrollo. El verano de 1962 trajo dos descubrimientos nada augurantes. El primero fue la revelación por Rachel Carson (1962) de que el pesticida DDT estaba destruyendo los huevos de las aves y estaba evitando la reproducción de varias especies (véase cap. 22). El segundo (Lenz 1962) fue el descubrimiento de que la talidomida, una droga sedante utilizada para administrarse en los embarazos, puede causar anomalías de las extremidades y del oído en el feto (véase cap. 1). Estos dos descubrimientos demostraron que el embrión era vulnerable a los agentes ambientales. Esto fue puesto de relieve en 1964, cuando una epidemia de rubéola (sarampión alemán) se diseminó a través de América. Cuando los adultos eran infectados por este virus mostraban síntomas relativamente leves, pero cerca de 20.000 fetos infectados por rubéola se volvieron ciegos, sordos o con ambos defectos. Muchos de estos niños también nacieron con defectos cardíacos o retardo mental (CDC 2002b).

Las anomalías causadas por los agentes exógenos son denominadas **disrupciones**. Los agentes responsables de estas disrupciones se denominan **teratógenos**.* La mayoría de los teratógenos produce sus efectos solamente durante ciertos períodos críticos del desarrollo. El desarrollo humano se divide frecuentemente en dos períodos, el **período embrionario** (hasta el final de la semana 8) y el **período fetal** (el tiempo en el útero a partir de este momento). Es durante el período embrionario que se forma la mayoría de los sistemas de órganos; el período fetal generalmente es de crecimiento y modelado. El período de máxima susceptibilidad a la teratogénesis es entre las semanas 3 y 8, debido a que es cuando los órganos se están formando. Sin embargo, el sistema nervioso está en constante formación y se mantiene susceptible durante todo el desarrollo. Antes de la semana 3, el embrión, en general, no es susceptible a la teratogénesis. Durante este tiempo, una sustancia que dañe la mayor parte o todas las células del embrión, resulta en su muerte, o solamente la de unas pocas células, permitiendo que el embrión se recupere. La figura 21-11 indica los momentos en los que varios órganos son más susceptibles a los teratógenos.

SITIO WEB 21.5 **Talidomida como un teratógeno (Thalidomide as a teratogen).** La droga talidomida causó que miles de recién nacidos tuvieran extremidades superiores e inferiores malformadas y proporcionó la primera evidencia fundamental de que la droga podía inducir anomalías congénitas. El mecanismo de su acción todavía es motivo de vehementes debates.

---

* En algunos casos, la misma condición puede ser una disrupción (causada por un agente exógeno) o una malformación (causada por una mutación genética). La condrodisplasia punctata es un defecto congénito del hueso y del cartílago, caracterizado por mineralización ósea anormal, poco desarrollo del cartílago nasal, y dedos acortados. Es causada por un gen defectuoso sobre el cromosoma X. Un fenotipo idéntico es producido por la exposición del feto al compuesto anticoagulante warfarina. Parece que el gen defectuoso es normalmente responsable de la producción de una proteína arilsulfatasa (CDPX2) necesaria para el crecimiento de cartílago. El compuesto warfarina inhibe a esta misma enzima (Franco y col. 1995).

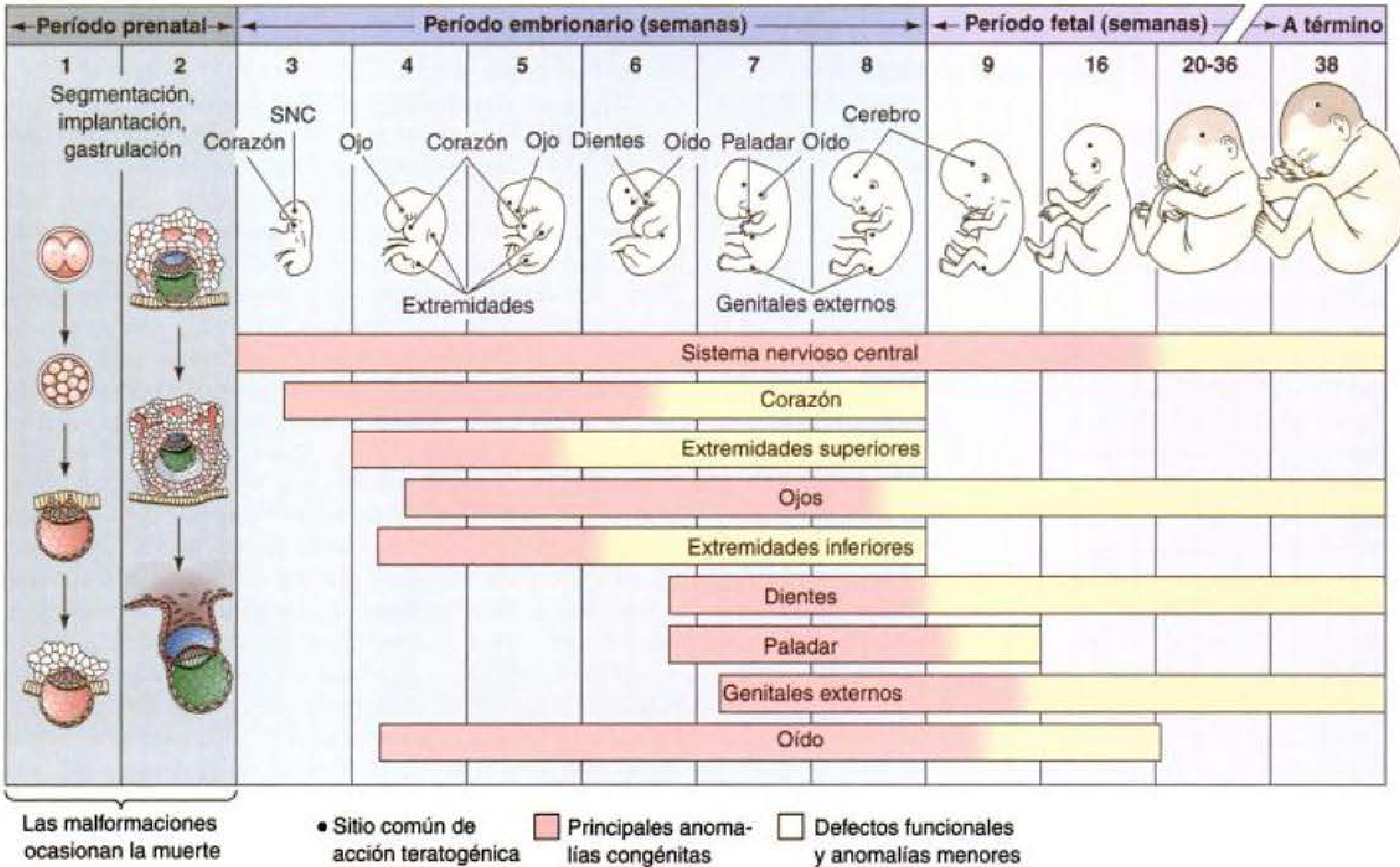


Fig. 21-11. Períodos (semanas de gestación) y grados de sensibilidad de los órganos embrionarios a los teratógenos. (Según Moore y Persaud 1993.)

Agentes teratogénicos

Diferentes agentes son teratogénicos en distintos organismos. En el cuadro 21-2 se muestra una lista parcial de agentes que son teratogénicos en humanos. La clase más grande de teratógenos incluye a las drogas y químicos, pero los virus, la radiación, la hipertermia y las alteraciones metabólicas en la madre también pueden actuar como teratógenos.

Algunos químicos, que naturalmente se encuentran en el ambiente, pueden causar defectos congénitos. Incluso se han encontrado teratógenos en las impecables praderas alpinas de las montañas Rocosas. Aquí crece el repollo de la mofeta *Veratrum californicum*, del que a veces se alimenta la oveja. Si una oveja preñada come esta planta, sus fetos tienden a desarrollar graves alteraciones neurológicas, incluyendo ciclopía, la fusión de los dos ojos en el centro de la cara (véase fig. 6-26). Dos productos producidos por esta planta, **jervina** y **ciclopamina**, inhiben la síntesis de colesterol en el feto e impiden el funcionamiento de Sonic hedgehog. En efecto, esta afección se asemeja a los síndromes genéticos humanos (discutido antes y en el capítulo 12) en los que los genes para Sonic hedgehog o para las enzimas que sintetizan colesterol están mutados (Beachy y col. 1997; Opitz y col. 2002). El organismo afectado muere poco después del nacimiento (como resultado de graves defectos del cerebro, incluida la ausencia de la glándula hipófisis).

La quinina y el alcohol, otras dos sustancias derivadas de las plantas, también pueden causar disrupciones del desarrollo. La quinina ingerida por una madre embarazada puede causar sordera y el alcohol puede provocar retardo físico y mental en el niño, como se verá a continuación. No se ha probado que la nicotina y la cafeína causen anomalías congénitas, pero las mujeres que son fumadoras importantes (20 cigarrillos por día o más) tienen probabilidades de tener niños que son más pequeños que los nacidos de mujeres que no fuman. Fumar también disminuye significativamente el número, la calidad y la motilidad de los espermatozoides en el semen de los hombres que fuman al menos 4 cigarrillos al día (Kulikauskas y col. 1985; Mak y col. 2000; Shi y col. 2001).

Además, cada año ingresan al uso general en nuestra sociedad industrial cientos de nuevos componentes artificiales. Los componentes de los pesticidas y el mercurio orgánico han causado anomalías neurológicas y del comportamiento en los niños cuyas madres han ingerido estos compuestos durante el embarazo. Además, las drogas que son utilizadas para controlar enfermedades en adultos pueden tener efectos perjudiciales sobre los fetos. Por ejemplo, el ácido valproico, es una droga anticonvulsivante utilizada para controlar la epilepsia. Se sabe que es teratogénico en seres humanos debido a que puede causar defectos espinales importantes y menores. Barnes y col. (1996) han demostrado que el ácido valproico disminuye el nivel de transcripción de *Pax1* en los somitas del pollo. Esta disminución causa malformaciones de los somitas y sus correspondientes malformaciones de las vértebras y de las costillas.

Cuadro 21-2 *Algunos agentes que se piensa causan disrupciones en el desarrollo fetal humano*[a]

DROGAS Y QUÍMICOS	RADIACIONES IONIZANTES (RAYOS X)
Alcohol	
Aminoglucósidos (gentamicina)	HIPERTERMIA
Aminopterina	MICROORGANISMOS INFECCIOSOS
Agentes antitiroideos (propiltiouracilo)	Virus Coxsackie
Bromina	Citomegalovirus
Cortisona	Herpes simple
Dietilestilbestrol (DES)	Parvovirus
Difenilhidantoína	Rubéola (sarampión alemán)
Heroína	*Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis)
Plomo	*Treponema pallidum* (sífilis)
Metilmercurio	
Penicilamina	ALTERACIONES METABÓLICAS EN LA MADRE
Ácido retinoico (isotretinoína)	Enfermedad autoinmune (que incluye la incompatibilidad Rh)
Estreptomicina	Diabetes
Tetraciclina	Deficiencias en la dieta, malnutrición
Talidomida	Fenilcetonuria
Trimetadiona	
Ácido valproico	
Warfarina	

Fuente: Adaptado de Opitz 1991.
[a] Esta lista incluye los agentes teratógenos conocidos y los posibles y no es exhaustiva.

Ácido retinoico como teratógeno

En algunos ejemplos, aun un compuesto que está involucrado en el metabolismo normal puede tener efectos nocivos si está presente en grandes cantidades en momentos particulares. El ácido retinoico es importante en la formación del eje anteroposterior del embrión de mamíferos así como en la formación de las extremidades (véanse caps. 11 y 16). En el desarrollo normal, el ácido retinoico es secretado desde células diferenciadas y trabaja en una pequeña área. Sin embargo, si el ácido retinoico está presente en grandes cantidades, las células que normalmente no recibirían altas concentraciones de esta molécula están expuestas a ella y responderán a ella.

El ácido 13-*cis*-retinoico ha sido útil en el tratamiento del acné quístico severo y ha estado disponible para este propósito (bajo el nombre registrado Accutane®) desde 1982. Debido a que los efectos nocivos de la administración de grandes cantidades de vitamina A o de sus análogos a animales preñados se conoce desde la década de 1950 (Cohlan 1953; Giroud y Martinet 1959; Kochhar y col. 1984), la droga lleva un rótulo de advertencia que indica que no debería utilizarse por las mujeres embarazadas. Sin embargo, cerca de 160.000 mujeres en edad fértil (15 a 45 años) han consumido esta droga desde que fue introducida y algunas de ellas la han utilizado durante el embarazo. Lammer y sus colegas (1985) estudiaron a un grupo de mujeres que inadvertidamente se expusieron al ácido retinoico y que decidieron continuar con su embarazo. De sus 59 fetos, 26 nacieron sin anomalía alguna evidente, 12 abortaron espontáneamente y 21 nacieron con anomalías evidentes. Los niños afectados tenían un patrón de anomalías característico, incluyendo orejas ausentes o defectuosas, mandíbulas ausentes o pequeñas, fisura del paladar, anomalías de arco aórtico, deficiencias tímicas y anomalías del sistema nervioso central.*

Este patrón de múltiples anomalías congénitas es semejante al observado en los embriones de rata y de ratón a cuyas madres preñadas se les habían administrado esta droga. Goulding y Pratt (1986) colocaron a los embriones de ratón de 8 días en una solución que contenía ácido 13-*cis*-retinoico a muy baja concentración (2×10^{-6} *M*). Aún a esta concentración, aproximadamente un tercio de los embriones desarrollaron un patrón muy específico de anomalías, que incluye la drástica reducción en el tamaño del primer y segundo arcos faríngeos (véase fig. 11-45). En los ratones normales, el primer arco forma finalmente el maxilar superior y el maxilar inferior de la mandíbula y dos huesecillos del oído medio, mientras que el segundo arco forma el tercer huesecillo del oído medio así como a otros huesos faciales.

Las bases para esta alteración del desarrollo parecen residir en la capacidad de las drogas para alterar la expresión de los genes Hox y de este modo reespecificar porciones del eje anteroposterior e inhibir la migración de las células de la cresta neural desde la región craneal del tubo neural (Moroni y col. 1994; Studer y col. 1994). El ácido retinoico marcado de forma radiactiva se une a las células de la cresta neural craneal y detiene su proliferación y migración (Johnston y col. 1985; Goulding y Pratt 1986). Esta unión parece ser específica para las células de la cresta neural craneal y el efecto teratogénico de la droga está limitado a un período de desarrollo específico (días 8-10 en ratones, días 20-35 en seres humanos). Los modelos animales de teratogénesis por ácido retinoico han sido extremadamente exitosos en esclarecer los mecanismos de la teratogénesis a nivel celular (véase cap. 11).

SITIO WEB 21.6 **Mecanismos de la teratogénesis del ácido retinoico (Mechanisms of retinoic acid teratogenesis).** Dentro de la célula, numerosas proteínas que unen ácido retinoico interactúan influyendo en la capacidad del ácido retinoico para transcribir genes particulares.

* El ácido retinoico es una preocupación crítica en salud pública debido a que hay una significativa superposición entre la población que utiliza la medicina para el acné y la población de mujeres en edad fértil, y debido a que se estima que la mitad de los embarazos en América no son planificados (Nulman y col. 1997). La vitamina A es en sí misma teratogénica en cantidades de megadosis. Rothman y col. (1995) hallaron que las mujeres embarazadas que tomaban más de 10.000 unidades internacionales de vitamina A por día (en la forma de suplementos de vitamina) tenían un 2% de posibilidades de tener un recién nacido con alteraciones similares a las producidas por el ácido retinoico.



Fig. 21-12. Comparación del cerebro en un niño con síndrome alcohólico fetal (SAF, izquierda) con el cerebro en un niño normal de la misma edad (derecha). El cerebro del niño con SAF es más pequeño, y el patrón de circunvoluciones está escondido por las células gliales que han migrado sobre la parte superior del cerebro. (Fotografías cortesía de S. Clarren.)

Alcohol como un teratógeno

En términos de la frecuencia de sus efectos y de su costo para la sociedad, el teratógeno más devastador es indudablemente el etanol. En 1968, Lemoine y col. observaron un síndrome de defectos al nacimiento en niños de madres alcohólicas. Este **síndrome alcohólico fetal (SAF)** fue confirmado por Jones y Smith (1973). Los recién nacidos con SAF se caracterizaban por el pequeño tamaño de la cabeza, un filtrum indistinguible (el par de crestas que corren entre la nariz y la boca por arriba del centro del labio superior), un labio superior delgado y un puente nasal bajo. El cerebro de estos niños puede ser espectacularmente más pequeño que el normal y con frecuencia muestra defectos en la migración neuronal y glial (fig. 21-12; Clarren 1986). También hay una importante muerte celular anormal en el proceso frontonasal y en los ganglios de los nervios craneales (Sulik y col. 1988). El síndrome alcohólico fetal es el tercer tipo de retardo mental más frecuente (detrás del síndrome de X frágil y del síndrome de Down) y afecta a 1 de cada 500-750 niños nacidos en los Estados Unidos (Abel y Sokol 1987).

Los niños con síndrome alcohólico fetal tienen retraso en el desarrollo y retraso mental con un coeficiente intelectual cercano a 68 (Streissguth y LaDue 1987). Se encontró que los pacientes con SAF que tienen una edad cronológica promedio de 16 años y medio tienen un vocabulario funcional de 6 años y medio de edad y capacidades matemáticas de cuarto grado. La mayoría de los adultos y adolescentes con SAF no puede ocuparse del dinero o de su propia vida, y tiene dificultades para aprender de sus experiencias anteriores. Además, en muchos casos de SAF, existen comportamientos anormales sin cambios físicos burdos en el tamaño de la cabeza o reducciones en el coeficiente intelectual (J. M. Opitz, comunicación personal).

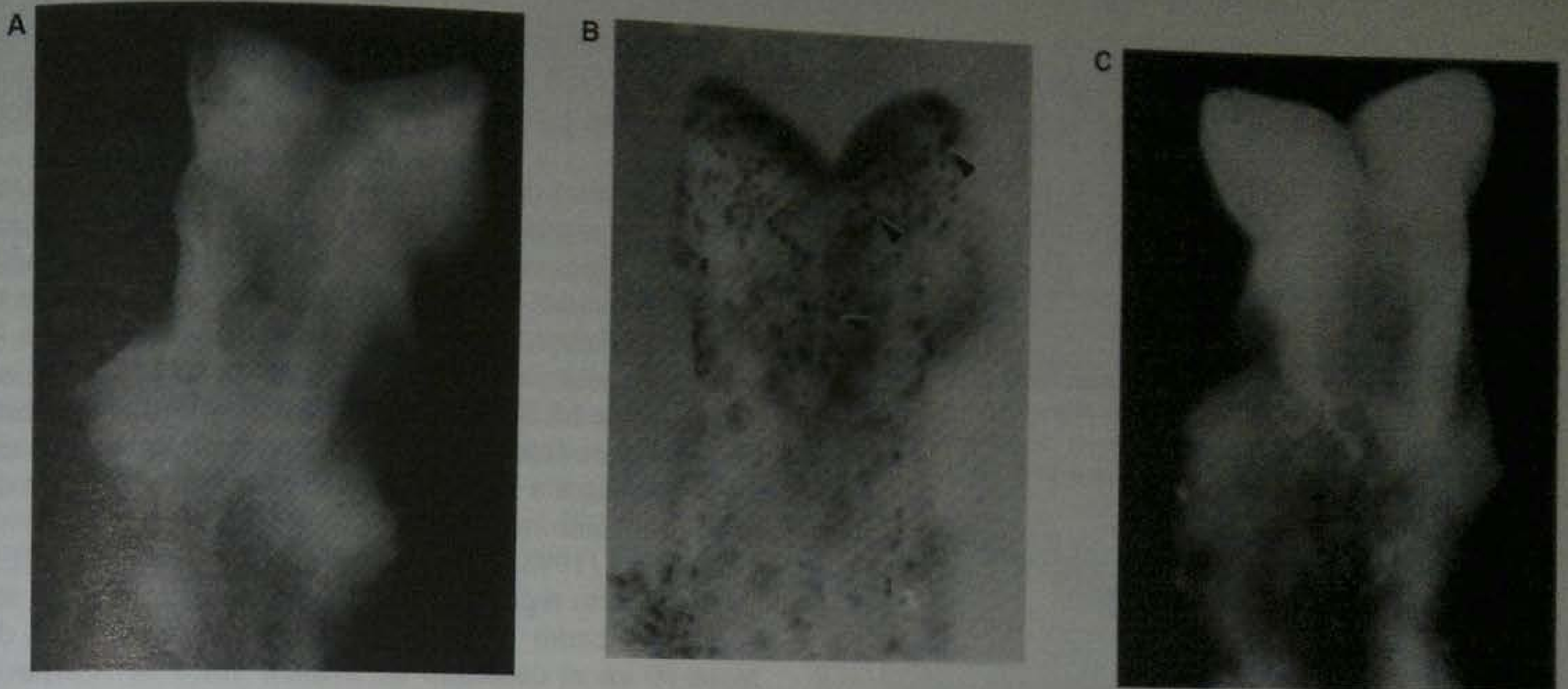
Hay una gran variación en la capacidad de las madres y de los fetos para metabolizar el etanol y se piensa que el 30-40% de los niños que nacen de madres alcohólicas que beben durante el embarazo tendrán SAF. También se piensa que cantidades mínimas de consumo de etanol por parte de la madre puede llevar a efectos alcohólicos fetales, una condición que es menos severa que el SAF, pero que disminuye las capacidades funcionales e intelectuales de la persona afectada.*

El sistema modelo de ratón ha sido utilizado para explicar los efectos del etanol sobre la cara y el sistema nervioso. Cuando los ratones son expuestos a etanol en el momento de la gastrulación, éste induce el mismo rango de defectos desarrollos que en el humano. Tan pronto como a las 12 horas después de la ingesta de alcohol por parte de la madre se observan las anomalías del desarrollo. Las estructuras faciales de la línea media no pueden formarse, lo que permite un cierre anormalmente próximo de los procesos mediales de la cara. También se observan anomalías del cerebro anterior y la mayoría de los fetos gravemente afectados carecen de un cerebro anterior completo (Sulik y col. 1988).

Los estudios sobre estos ratones sugieren que el etanol puede inducir sus efectos teratogénicos por más de un mecanismo. En primer lugar, la evidencia anatómica sugiere que la migración de las células de la cresta neural está severamente afectada. En lugar de migrar y dividirse, las células de la cresta neural tratadas con etanol inician su diferenciación prematuramente hacia el cartílago facial (Hoffman y Kulyk 1999). En segundo lugar, el etanol puede causar la apoptosis de las neuronas. Un modo en el que puede hacer esto es mediante la generación de radicales superóxido que pueden oxidar las membranas celulares y llevar a la citólisis (fig. 21-13A-C; Davis y col. 1990; Kotch y col. 1995). La apoptosis inducida por etanol puede eliminar millones de neuronas del cerebro anterior en desarrollo, de los ganglios nerviosos craneales y de células del proceso frontonasal (facial). En tercer lugar, el alcohol puede interferir directamente con la capacidad de la molécula de adhesión celular L1 para mantener a las células juntas. Ramanathan y col. (1996) han demostrado que el etanol puede bloquear la función adhesiva de la proteína L1 in vitro a niveles tan bajos como 7 m*M*, una concentración de etanol producida en la sangre o en el cerebro con beber una sola copa (fig. 21-13D). Además, las mutaciones en el gen *L1* humano causan un síndrome de retraso mental y de malformaciones similar al visto en varios casos severos de síndrome alcohólico fetal.

En el embrión de pollo, ha sido hallado un cuarto mecanismo por cual el etanol puede alterar el desarrollo (Ahlgren y col. 2002). Etanol inyectado en el amnios de un embrión de pollo resulta en la apoptosis de las células de la cresta neural craneal y en el fracaso para formar los procesos frontonasales. Esta apoptosis fue correlacionada con una pérdida de la expresión del gen *sonic hedgehog* en los arcos faríngeos. Además, si las células que se-

* Para un extraordinario relato del ascenso de un niño con síndrome alcohólico fetal, así como un análisis del SAF en la cultura nativa americana de los Estados Unidos, véase *La cuerda rota* (*The broken cord*) (1989) de Michael Dorris, en el que están bien integrados los efectos personales y sociológicos del SAF con los datos científicos y económicos.



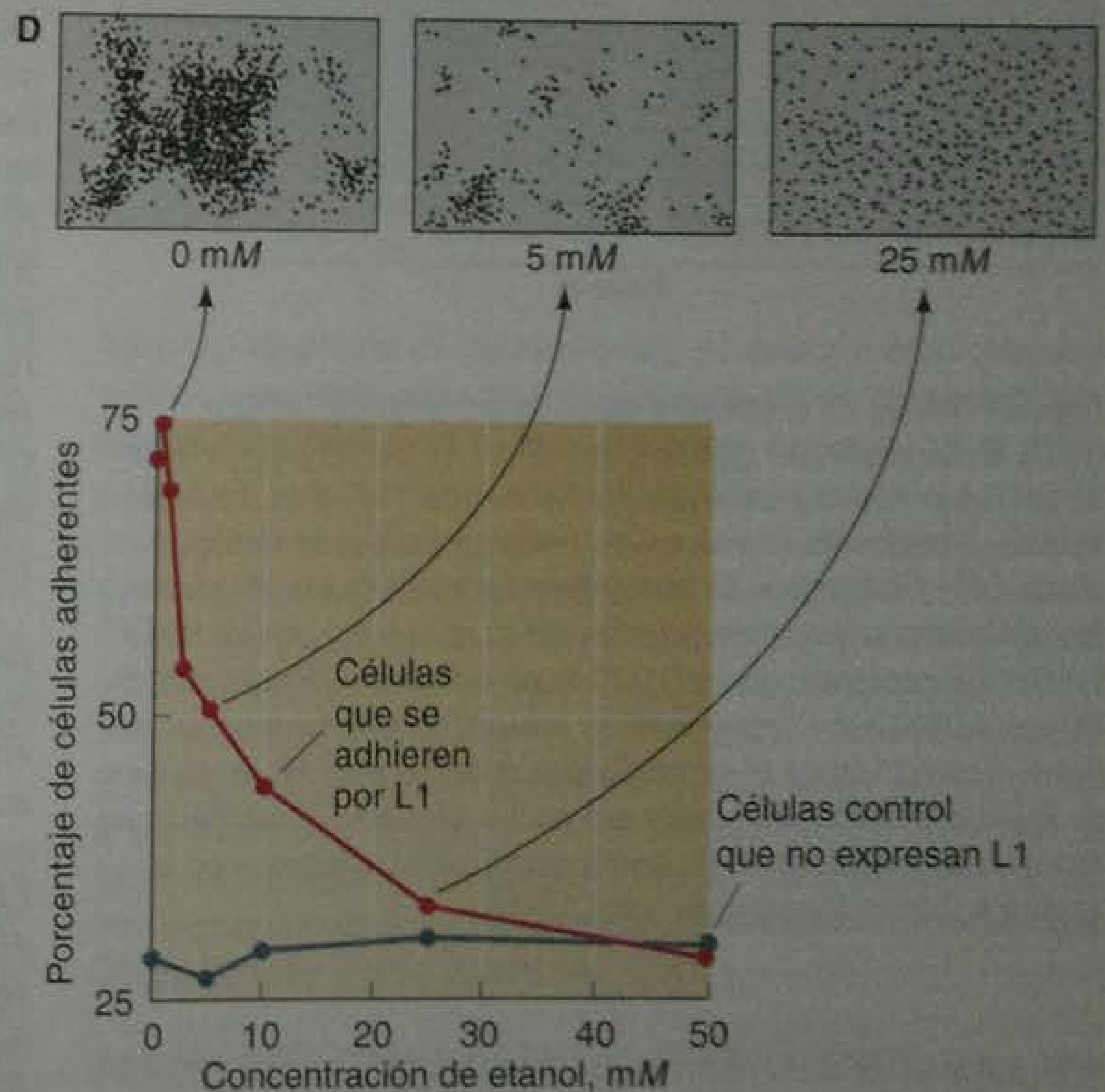


Fig. 21-13. Mecanismos posibles que producen el síndrome alcohólico fetal (SAF). A-C. Muerte celular causada por radicales superóxido inducidos por etanol. La tinción con sulfato de azul del Nilo muestra áreas de muerte celular. A. Región de la cabeza de un embrión control de ratón de 9 días. B. Región de la cabeza de un embrión tratado con etanol, que muestra áreas de muerte celular. C. Región de la cabeza de un embrión tratado con etanol y superóxido dismutasa, un inhibidor de radicales superóxido. La enzima impide la muerte celular inducida por alcohol. D. La inhibición por etanol de la adhesión celular mediada por L1. (A-C, de Kotch y col. 1995, fotografías cortesía de K. Sulik; D, según Ramanathan y col. 1996.)

cretan Sonic hedgehog eran colocadas en el mesénquima de la cabeza en este momento, evitaban la apoptosis inducida por etanol de las células de la cresta neural craneal. Conjuntamente, estos estudios muestran que el etanol es excepcionalmente peligroso para el desarrollo de los vertebrados debido a que está demasiado extendido, porque puede atravesar la placenta y porque puede funcionar de varios modos.

SITIO WEB 21.7 **Nuestro conocimiento sobre la teratogenicidad del alcohol (Our knowledge of alcohol's teratogenicity).** Unos cien años atrás, el alcohol era considerado peligroso para el feto. Cincuenta años atrás, era considerado inocuo y en la actualidad se lo considera muy peligroso. Los estudios sociológicos analizan cómo se llegaron a estas valoraciones.

Disruptores endocrinos

Los **disruptores endocrinos** (a veces denominados imitadores de hormonas o reguladores de la señal ambiental) son químicos exógenos que interfieren con la función normal de las hormonas. Los disruptores endocrinos pueden alterar la función hormonal de varios modos:

- Pueden imitar los efectos de la hormona natural mediante la unión a los receptores de la hormona. DES (dietilestilbestrol) es un ejemplo, como se verá más adelante.
- Pueden bloquear la unión de una hormona a su receptor, o pueden bloquear la síntesis de la hormona. La finasterida, una droga utilizada para impedir el patrón de calvicie masculino y el agrandamiento de la glándula prostática, es un antiandrógeno, debido a que bloquea la síntesis de dihidrotestosterona. La dihidrotestosterona (como se vio en el cap. 17) es necesaria para el desarrollo de los genitales externos masculinos, la diferenciación de la próstata y el descenso de los testículos; de modo tal que las mujeres están advertidas de no tocar esta droga si están embarazadas.
- Pueden interferir con el transporte de una hormona o su eliminación del cuerpo. Los **bifenilos policlorados (PCB**; véase a continuación) actúan de este modo, como se verá en el siguiente capítulo.

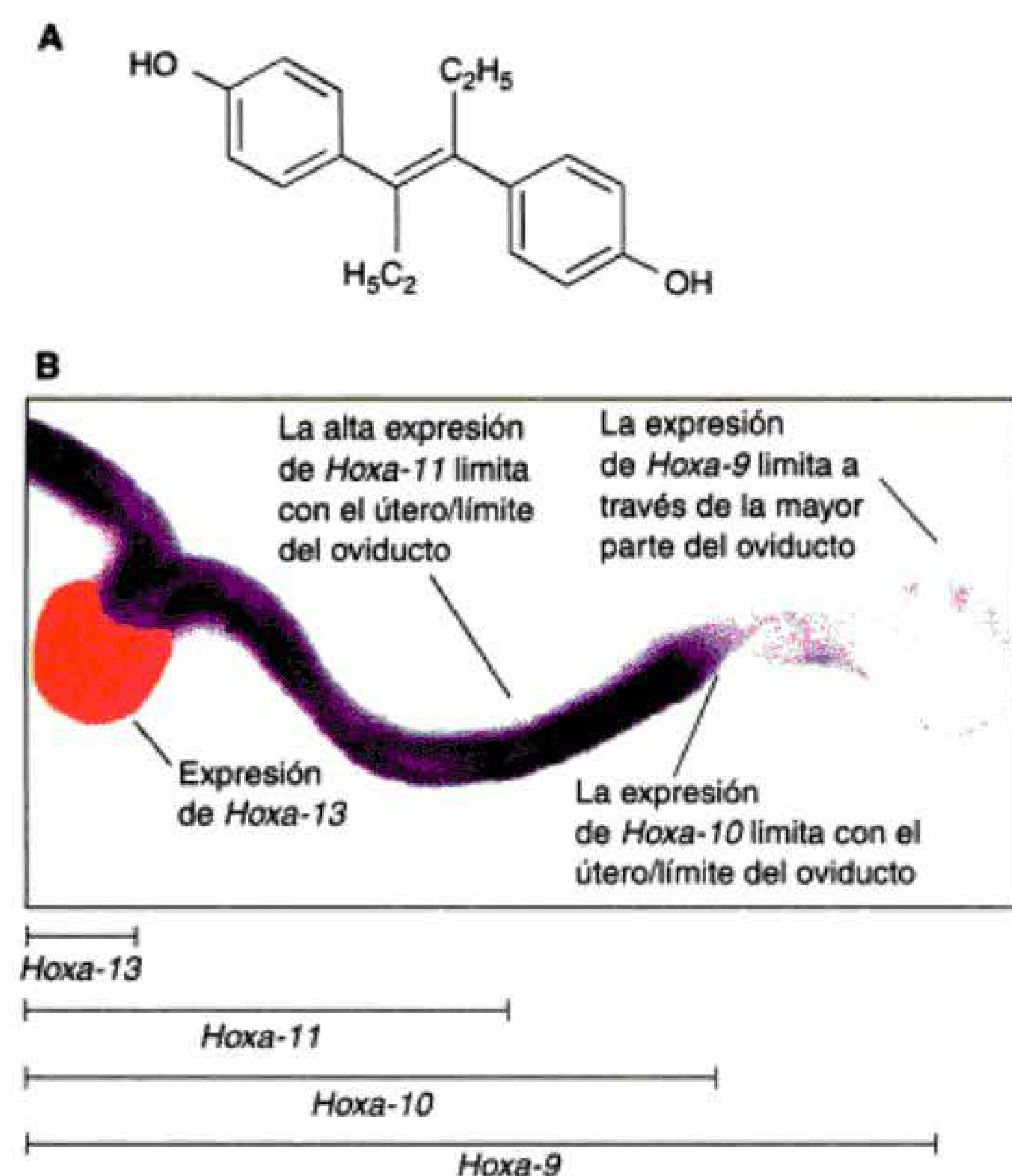


Fig. 21-14. A. La estructura química del dietilestilbestrol (DES). **B.** La expresión génica Hoxa 5´ en el sistema reproductor de un ratón hembra embrionario normal de 16,5 días. Se muestra una hibridación in situ en un embrión entero de la sonda *Hoxa-13.* La expresión de *Hoxa-9* se extiende desde el primordio del cuello uterino hasta cerca de la mitad del conducto de Müller. La expresión de *Hoxa-10* tiene un borde anterior definido en la transición entre el útero presuntivo y la trompa de Falopio. *Hoxa-11* tiene el mismo borde anterior que *Hoxa-10*, pero su expresión disminuye cerca del cuello uterino. La expresión de *Hoxa-13* se encuentra solamente en el cuello uterino y en la vagina superior. (Según Ma y col. 1998.)

En este capítulo se verán los efectos conocidos y los posibles de los disruptores endocrinos sobre el desarrollo humano. El siguiente capítulo, sobre la regulación del desarrollo ambiental, proporcionará evidencia de que los disruptores endocrinos ambientales están provocando alteraciones en el desarrollo de los animales salvajes. Algunos disruptores endocrinos son los productos de la bioquímica de las plantas naturales. Otros no lo son, como los estabilizadores utilizados en la manufactura del poliestireno y de otros plásticos.

Uno de los estrógenos ambientales más potentes ha sido el **dietilestilbestrol**, una droga que fue recetada para aproximadamente 5 millones de mujeres embarazadas desde la década de 1940 hasta la de 1960 para impedir el aborto espontáneo y el trabajo de parto prematuro (véase Palmund 1996; Bell 1986). Aunque la investigación desde mediados de 1950 demostró que DES no tenía efectos beneficiosos sobre el embarazo, éste continuó siendo recetado hasta los comienzos de la década de 1970, cuando se demostró que las mujeres expuestas a esta droga in útero tenían incrementadas las posibilidades de tener cáncer de cuello uterino y anomalías morfológicas del tracto reproductivo. Los hijos varones que habían sido expuestos a DES in utero frecuentemente tenían anomalías genitales (véase Robboy y col. 1982; Mittendorf 1995).

Las anomalías del tracto reproductivo femenino que resultan de la exposición prenatal a DES involucran cambios en los tipos celulares a lo largo del conducto de Müller. En particular, hay una pérdida de los límites entre la trompa de Falopio y el útero debido a la ausencia de la unión uterotubaria. Además, los extremos distales de los conductos de Müller frecuentemente fracasan en su acercamiento para formar un único canal cervical. En los ratones expuestos a DES in útero se producen síntomas similares al síndrome por DES humano.

Ma y col. (1998) demostraron que los efectos del DES sobre el tracto reproductivo del ratón hembra pueden ser explicados como resultado de la expresión alterada de *Hoxa-10* en el conducto de Müller. Ellos demostraron que el estrógeno y la progesterona son capaces de regular a los genes 5´ del grupo Hoxa (*Hoxa-9, Hoxa-10, Hoxa-11* y *Hoxa-13*). Normalmente, estos genes están regulados a modo de un patrón anidado a lo largo del conducto de Müller. El mensajero de *Hoxa-9* se detecta en todo el útero y continúa hasta cerca de la mitad de camino a través del oviducto presuntivo. La expresión de *Hoxa-10* presenta un límite anterior definido en la unión entre el futuro útero y el futuro oviducto (trompa de Falopio). *Hoxa-11* tiene una fuerte expresión en las regiones anteriores donde se expresa *Hoxa-10*, pero es más débil en las regiones posteriores. La expresión de *Hoxa-13* se observa solamente en el cuello uterino (fig. 21-14).

Para determinar si DES cambiaba los patrones de expresión génica de Hox, se inyectó DES bajo la piel de ratones hembra preñadas y se les permitió a los fetos desarrollarse hasta casi el nacimiento. Cuando los fetos de madres inyectadas con DES fueron comparados con fetos de madres que no habían recibido DES, se vio que DES reprimía casi por completo la expresión de *Hoxa-10* en el conducto de Müller (fig. 21-15). Esta represión fue más pronunciada en el estroma (mesénquima) del conducto, el lugar donde los embriólogos experimentales habían localizado el efecto del DES (Boutin y Cunha 1997). El caso para el DES que actúa a través de la represión de *Hoxa-10* es fortalecido por el fenotipo del ratón knockout *Hoxa-10* (Benson y col. 1996; Ma y col. 1998), en el que hay una transformación del cuarto proximal del útero hacia tejido del oviducto y hay anomalías de la unión uterotubárica.

El vínculo entre la expresión génica Hox y la morfología uterina lo constituyen las proteínas Wnt. Las proteínas Wnt están asociadas con la proliferación celular y la protección contra la apoptosis, y los tractos reproductivos de ratones hembras expuestos a DES también se asemejan a los knockouts de *Wnt7a*. Miller y colegas (1998) han demostrado que los genes Hox y los genes Wnt se comunican para mantenerse activados uno a otro. Además, las proteínas Hox y Wnt están involucradas en la especificación y morfogénesis de los tejidos reproductivos (fig. 21-16). Sin embargo, DES que actúa a través del receptor de estrógeno, reprime al gen *Wnt7a*. Esta represión impide el mantenimiento del patrón de expresión génica Hox y evita la activación de otro gen Wnt, *Wnt5a*, que codifica una proteína necesaria para la proliferación celular.

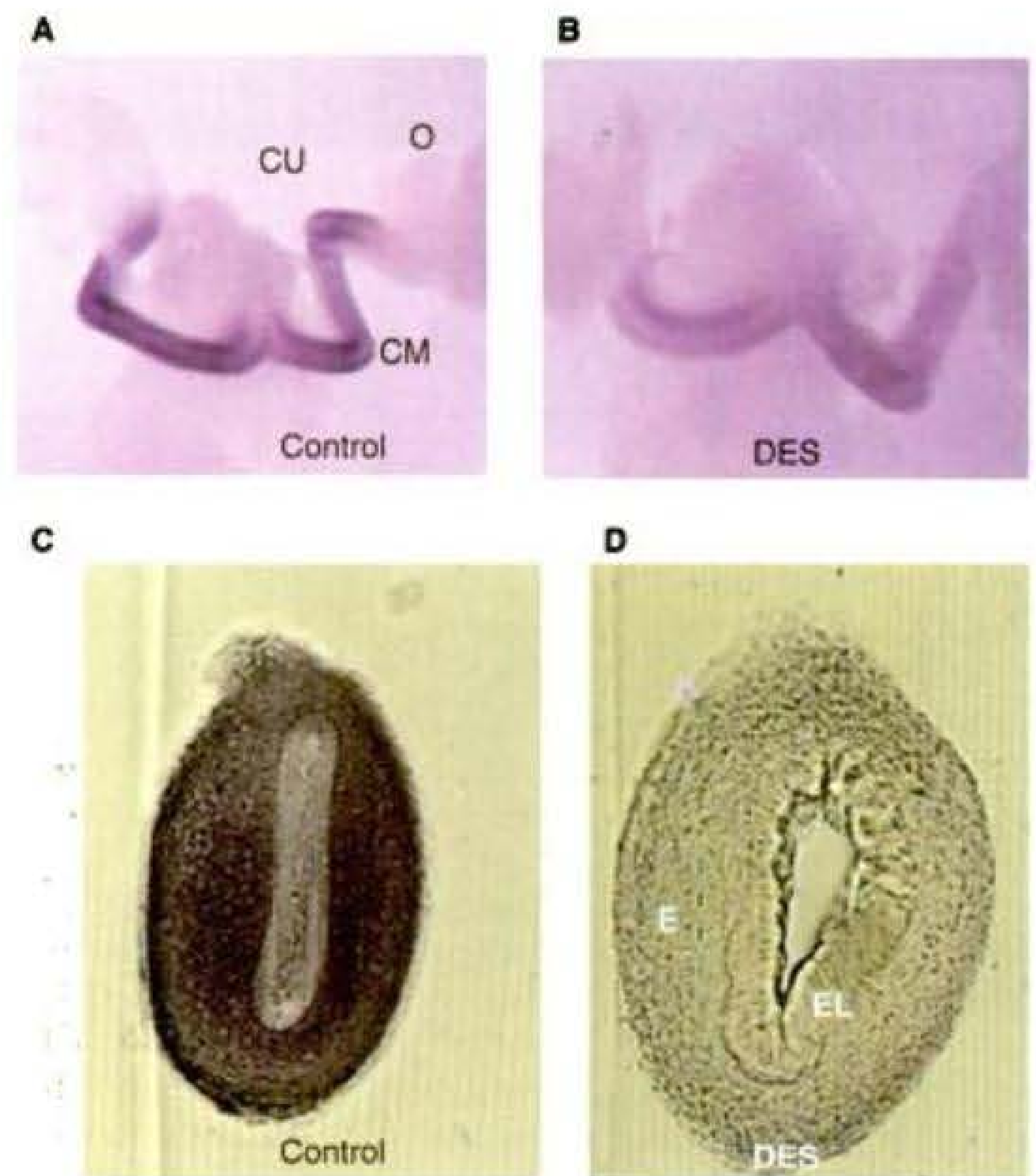


Fig. 21-15. La hibridación in situ de una sonda de *Hoxa-10* muestra que la exposición a DES reprime a *Hoxa-10*. **A.** Los ratones hembra normales de 16,5 días muestran la expresión de *Hoxa-10* desde el límite del cuello uterino a través del primordio del útero y a lo largo de la mayor parte de la trompa de Falopio. **B.** En los ratones expuestos prenatalmente a DES, esta expresión fue reprimida severamente. **C.** En los ratones hembra control a los 5 días después del nacimiento (cuando el tejido reproductivo todavía está formándose), una sección a través del útero muestra abundante expresión del gen *Hoxa-10* en la estroma uterina. **D.** En los ratones hembra a los que se les administró altas dosis de DES a los 5 días después del nacimiento, se suprimió casi completamente la expresión del gen *Hoxa-10* en el mesénquima. CU, cuello uterino; CM, conducto de Müller; O, ovario; EL, epitelio luminal; E, estroma. (Según Ma y col. 1998.)

Otros agentes teratogénicos

Cerca de 50.000 químicos artificiales se utilizan actualmente en los Estados Unidos y cerca de 200 a 500 nuevos componentes están siendo producidos cada año (Johnson 1980). Aunque los compuestos teratogénicos siempre han estado entre nosotros, el riesgo se incrementa más y más al ingresar en nuestro ambiente compuestos sin analizar. La mayor parte de las industrias químicas no ha sido sometida a una investigación para sus efectos teratogénicos. Los protocolos estándar de investigación son caros, largos y sujetos a diferencias en el metabolismo entre especies. Todavía no hay consenso sobre cómo estudiar la teratogenicidad de una sustancia para los embriones humanos.

METALES PESADOS. Los metales pesados, tales como el cinc, el plomo y el mercurio, son poderosos teratógenos. La polución industrial ha resultado en elevadas concentraciones de metales pesados en el ambiente en muchos lugares. En la antigua Unión Soviética, el enfoque desregulado "producción industrial a todo costo" ha dejado como legado un aumento del índice de defectos congénitos. En algunas regiones de Kazakhstan, se encontraron metales pesados en concentraciones elevadas en el agua potable, en los vegetales y en el aire. En estos lugares, cerca de la mitad de las personas estudiadas tenía extensas roturas cromosómicas. En algunas áreas, la incidencia de defectos congénitos se habían duplicado desde 1980 (Edwards 1994). El plomo y el mercurio pueden provocar daño al sistema nervioso en desarrollo. La contaminación de la Bahía de Minamata, Japón, con mercurio en 1956 produjo deficiencias cerebrales por la transmisión de mercurio a través de la placenta y por su transmisión a través de la leche de la madre. Parece que el mercurio se absorbe selectivamente en las regiones de la corteza cerebral (Eto 2000; Kondo 2000; Eto y col. 2001).

PATÓGENOS COMO AGENTES TERATÓGENOS. Otra clase de teratógenos incluye a los virus y a otros patógenos. Gregg (1941) fue el primero en documentar el hecho de

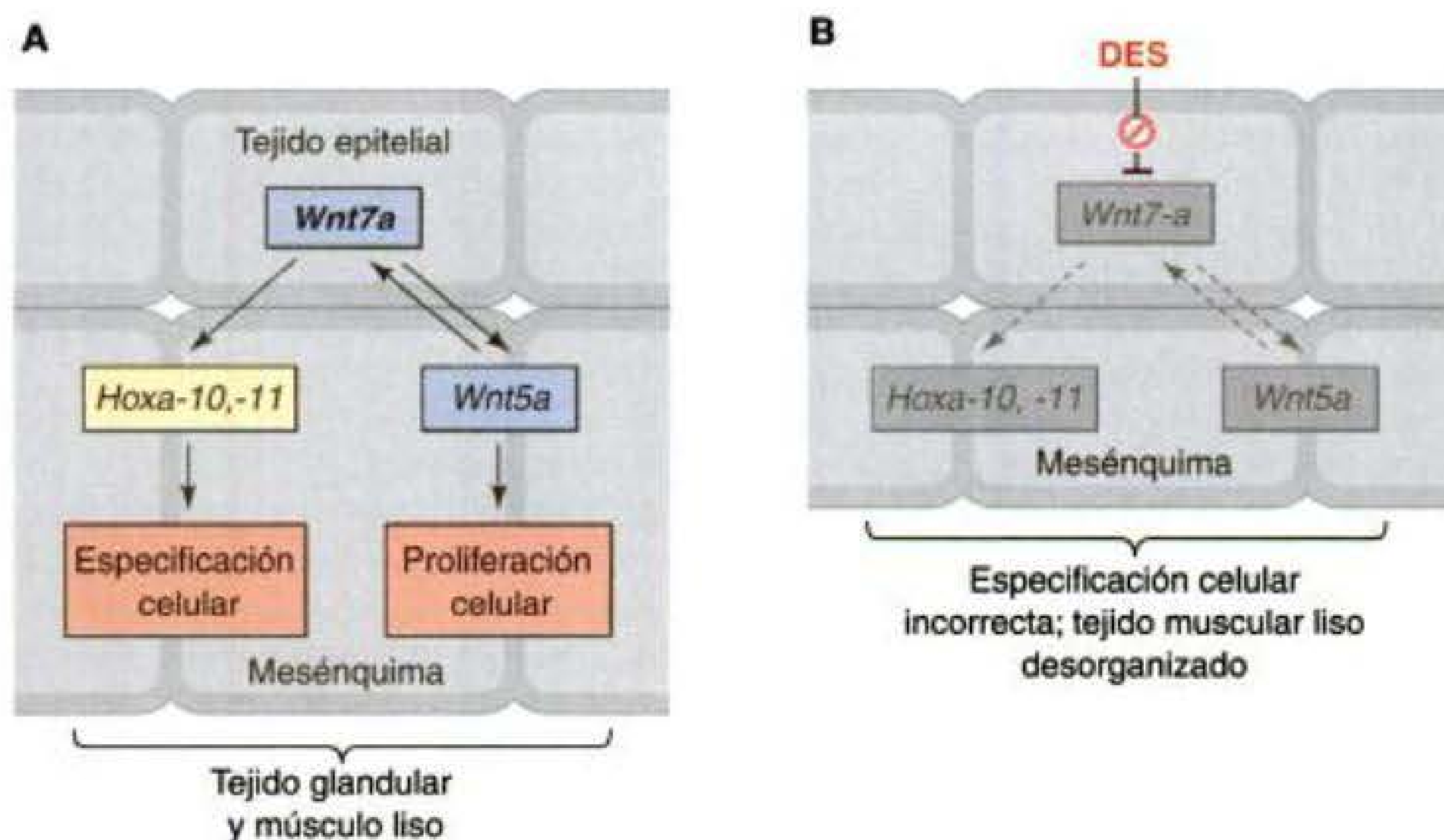


Fig. 21-16. Regulación alterada por DES de la morfogénesis del conducto de Müller. **A.** Durante la morfogénesis normal, los genes *Hoxa-10* y *Hoxa-11* son activados en el mesénquima y mantenidos por Wnt7a desde el epitelio. Wnt7a también induce a Wnt5a en el mesénquima, y Wnt5a mantiene la expresión de Wnt7a y causa la proliferación celular del mesénquima. Conjuntamente, estos factores especifican y ordenan la morfogénesis del útero. **B.** DES, que actúa a través del receptor de estrógeno, bloquea la expresión de Wnt7a. No se produce la adecuada activación de los genes Hox y de *Wnt5a* en el mesénquima, lo cual lleva a una morfología radicalmente alterada. (Según Kitajewsky y Sassoon 2000.)

Información adicional y especulaciones

La historia del DES: ¿está sucediendo nuevamente?

La tragedia del DES es una compleja historia de la política pública, de la medicina y del desarrollo (Palmund 1996; Bell 1986). Sin embargo, de acuerdo con Frederick vom Saal, Ana Soto y otros, el público y la industria farmacéutica han aprendido poco desde la tragedia del DES y actualmente se podría experimentar la misma alteración endocrina, solamente que a una escala mucho más grande. Estos investigadores afirman que algunos de los principales constituyentes de los plásticos son compuestos estrogénicos, que están presentes en dosis lo suficientemente grandes como para tener profundos efectos sobre el desarrollo y el comportamiento sexual y que la industria del plástico está librando una batalla contra la conciencia pública en este tema.

Nonilfenol

Los compuestos estrogénicos están en la comida de la que nos alimentamos y en los envoltorios plásticos que la rodea. El descubrimiento del efecto estrogénico de los estabilizadores plásticos fue hecho de un modo particularmente alarmante. Los investigadores de la Tufts University Medical School han estado estudiando células tumorales que responden a estrógenos, que requieren de estrógeno para poder proliferar. Sus estudios estaban yendo adecuadamente hasta 1987, cuando los experimentos repentinamente comenzaron a salir mal. Sus células control comenzaron a tener elevados índices de crecimiento sugiriendo una estimulación comparable a la de las células tratadas con estrógenos. Por lo tanto, esto fue como si alguien hubiese contaminado el medio agregando estrógenos a éste. ¿Cuál era la fuente de contaminación? Después de pasar 4 meses analizando todos los componentes de su sistema experimental, los investigadores descubrieron que la fuente de estrógeno eran los recipientes de plástico que contenían el agua y el suero. La compañía que había hecho los recipientes se rehusó a describir su nuevo proceso para la estabilización del plástico poliestireno, de modo tal que los científicos tuvieron que descubrirlo por sí mismos.

El culpable en producirlo era ***p*-nonilfenol**, un compuesto que también es utilizado para endurecer el plástico de las tuberías que nos traen el agua y para estabilizar los plásticos poliestirenos en los que se almacena agua, leche, jugo de naranja y otros productos alimenticios líquidos comunes (Soto y col. 1991; Colburn y col. 1996). Este compuesto también es el producto de degradación de los detergentes, limpiadores de hogares y cremas anticonceptivas. Se ha demostrado que el nonilfenol altera la fisiología reproductiva en los ratones hembra y altera la función de los espermatozoides. También está correlacionado con anomalías de desarrollo en la vida salvaje (Fairchild y col. 1999; Hill y col. 2002; Kim y col. 2002; Adeoya-Osiguwa y col. 2003).

Bisfenol A

El **bisfenol A** fue en realidad sintetizado como un compuesto estrogénico en la década de 1930. En los primeros años de investigación de la hormona fue muy difícil de aislar la hormona esteroide real, entonces los químicos elaboraron análogos sintéticos que podían llevar a cabo la misma tarea. Bisfenol A fue sintetizado por Dodds, quien demostró en 1936 que éste era estrogénico. (Dos años más tarde, Dodds sintetizó el dietilestilbestrol.) Posteriormente, los químicos de polímeros se dieron cuenta de que el bisfenol A podía ser utilizado en la producción de plástico, y actualmente éste es uno de los 50 químicos que más se producen. Cuatro corporaciones en los Estados Unidos producen casi 2 mil millones de libras de bisfenol A cada año para el uso en las resinas de revestimiento en la mayor parte de los enlatados, en los carbonatos plásticos, de los biberones para los bebés y en los juguetes de los niños, y en los selladores dentales. Su forma modificada, tetrabromo bisfenol A, es la principal molécula involucrada en retrasar las llamas de los tejidos del mundo.

Sin embargo, vom Saal (2000) afirmó que este químico no está fijo en los plásticos para siempre. Él afirmó que si se coloca agua en una vieja jaula de rata de policarbonato, se pueden medir en el agua hasta 100 mg por litro de bisfenol A. Ésta es una cantidad biológicamente activa –una concentración que podría invertir el sexo de una rana colocada en esta solución. Del mismo modo, cuando se arrojan productos que contienen bisfenol A hacia un depósito de basura cubierto de tierra, el bisfenol A se libera de ellos.

Vom Saal y sus colegas afirman que sus experimentos demuestran que las concentraciones de bisfenol A ambientalmente relevantes (y de otros compuestos estrogénicos) pueden causar alteraciones en la morfología de los órganos sexuales fetales, un bajo recuento de espermatozoides y cambios en el comportamiento cuando los fetos llegan a ser adultos (vom Saal y col. 1998; Palanza y col. 2002). Vom Saal y col. han implicado al bisfenol A (y a compuestos estrogénicos relacionados como las dioxinas) en un juego de tendencias, que incluye la disminución del recuento de espermatozoides humanos, el incremento en el aumento del tamaño de la próstata y la disminución en la edad de maduración sexual femenina.

La edad en la que las niñas comienzan a expresar características sexuales femeninas adultas ha disminuido durante los últimos cien años (probablemente debido a la nutrición), pero las nuevas investigaciones sugieren que la pubertad está comenzando extremadamente temprano (Herman-Giddens y col. 1997). El trabajo de laboratorio de vom Saal (Howdeshell y col. 1999) demostró que cuando los ratones hembra son expuestos intra útero a bajas dosis de bisfenol A, aquellos ratones experimentaban la madurez sexual mucho más rápido que los ratones no expuestos.

En 1992, Carlsen y col. informaron a partir de estudios alrededor del mundo un gran promedio de declinación en el recuento de espermatozoides. Este hallazgo ha sido confirmado recientemente por Swan y col. (2000), quienes también llegaron a la conclusión que, en promedio, la densidad y la calidad

de los espermatozoides humanos había declinado significativamente durante las últimas cinco décadas.

Estos estudios también implican al bisfenol A (y a otros compuestos estrogénicos) en causar el incremento en el tamaño de la próstata visto en el hombre. En los Estados Unidos, el 65% de los hombres en edad de jubilarse tienen las glándulas prostáticas aumentadas de tamaño, y cada año mueren 40.000 hombres de cáncer de próstata. A modo de estudio, los investigadores utilizaron la próstata de ratón, una glándula cuyo tamaño es sensible a los estrógenos. vom Saal y col. (1998) hallaron que cuando les daban a los ratones hembra preñadas 2 partes por 1000 millones de bisfenol A –esto es, 2 nanogramos por gramo de peso corporal– por 7 días al final del embarazo (equivalente al período cuando se están desarrollando los órganos reproductores humanos), los animales tratados mostraron un aumento en el tamaño de la próstata de cerca del 30%. En efecto, el área total normalmente estimulada por la dihidrotestosterona estaba aumentada de tamaño. El tamaño de la próstata estaba incrementado y el recuento de espermatozoides de los ratones estaba disminuido. Los ratones machos adultos expuestos a pequeñas cantidades de bisfenol A han incrementado el tamaño de la próstata, y el bisfenol A incrementa el índice de mitosis en las células prostáticas humanas (fig. 21-17; Gupta 2000; Ramos y col. 2001; Wetherill 2002). Los ratones hembra expuestos al bisfenol A intra útero tenían alteraciones en la organización de su tejido mamario y ovárico, y el ciclo estral alterado cuando eran adultos (Markey y col. 2003).

¿Pero hay alguna evidencia de que el bisfenol A alcance al feto en importantes concentraciones? Lamentablemente, estudios recientes (Ikezuki y col. 2002; Schöenfelder y col. 2002) han demostrado que el bisfenol A en la placenta humana no se elimina ni se metaboliza hacia un compuesto inactivo; en su lugar, se acumula hasta concentraciones que pueden alterar el desarrollo en los animales de laboratorio.

La industria del plástico replica que la evidencia de vom Saals es escasa y que sus experimentos no pueden ser repetidos (Cagen y col. 1999; véase Lamb 2002). Sin embargo, una revisión de los estudios de la propia industria (que afirman que los ratones expuestos intra útero al bisfenol A no tienen próstatas agrandadas y bajos recuentos de espermatozoides) señala que el control positivo de la investigación subvencionada por la industria no produce los efectos esperados.

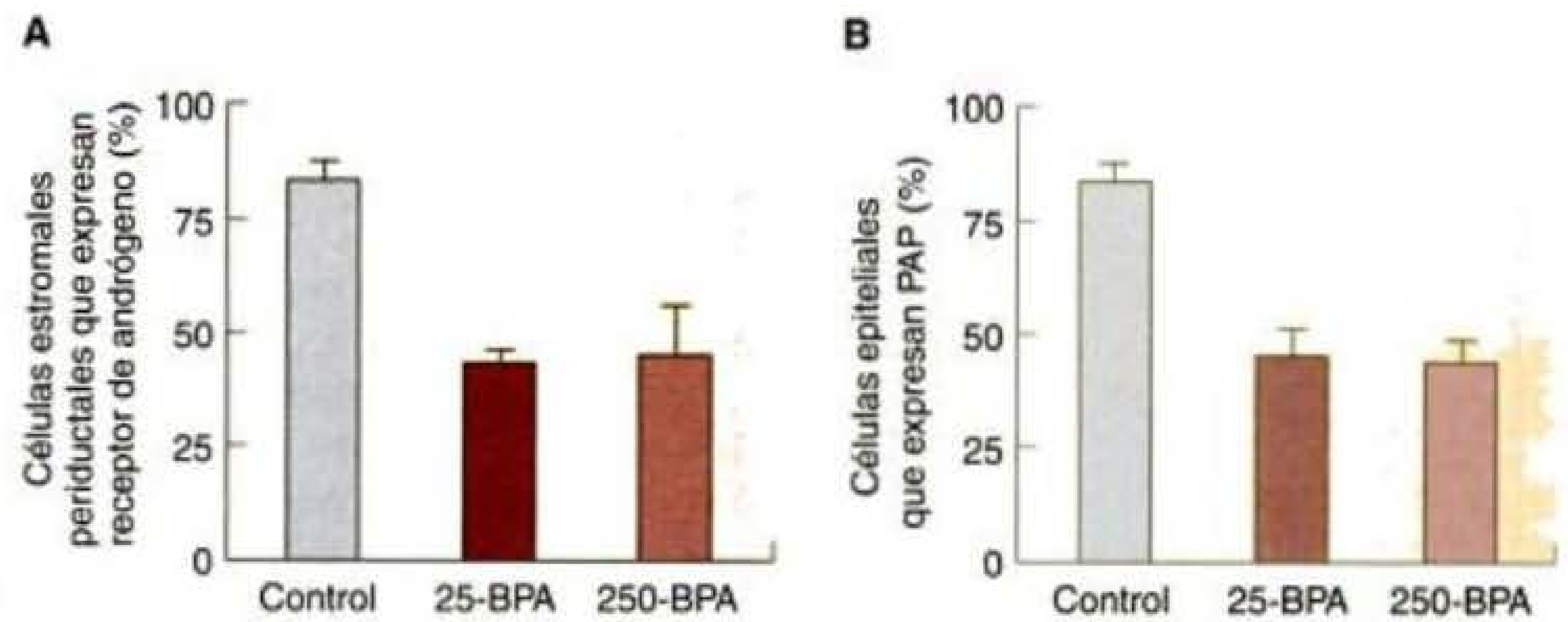


Fig. 21-17. El bisfenol A reduce la expresión del receptor de andrógeno y de la fosfatasa ácida prostática en la próstata ventral de las ratas expuestas intraútero a este compuesto. **A.** Expresión del receptor de andrógeno en las células estromales periductales de la próstata ventral de la rata. Dos grupos tratados con bisfenol A (a cuyas madres se les administró 25 μg/kg/día o 250 μg/kg/día de bisfenol A (BPA) desde el día embrionario 8 hasta el nacimiento) tuvieron porcentajes más pequeños de células estromales que contenían receptor de andrógeno que las ratas control. **B.** Expresión de fosfatasa ácida prostática en las células epiteliales en la próstata ventral de las ratas. En los animales control, muchas más células epiteliales glandulares fueron positivas para la fosfatasa ácida prostática que en los grupos tratados con bisfenol A. Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,01$). (Según Ramos y col. 2001.)

Pesticidas

Bell y col. (2001) utilizaron los registros y la investigación epidemiológica del estado de California para demostrar que las muertes debidas a anomalías congénitas se incrementaban significativamente en aquellas áreas rociadas con pesticidas. El mayor riesgo de muerte fetal debido a anomalías congénitas fue visto cuando los pesticidas fueron rociados durante la tercera a octava semana del embarazo. Se halló que aquellos niños expuestos a los pesticidas intra útero tenían menos habilidades motoras maduras que los no expuestos a los pesticidas (Guillette y col. 1998).

Uno de los pesticidas *teratogénicos* más importantes es el DDT, que es discutido extensamente en el siguiente capítulo. En los seres humanos, el DDT ha sido relacionado con nacimientos prematuros y con bebés inmaduros (Longnecker y col. 2001).

Genisteína

Otro químico estrogénico que está comenzando a causar inquietudes es la **genisteína**. La genisteína es el principal compuesto estrogénico en la soja y en los productos de soja (como el queso de soja). Para las personas que se alimentan de una dieta normal, esto no parece generar mucha preocupación (en efecto, estos compuestos pueden proteger contra ciertos cánceres). Sin embargo, los investigadores del Institute of Environmental Health Science (Newbold y col. 2001) están preocupados porque los niños que nacieron vegetarianos o de madres vegetarianas y a quienes para beber se les da solamente fórmulas basadas en soja pueden desarrollar anomalías del sistema reproductivo y de las glándulas tiroideas. Sus inquietudes están basadas en experimentos que demuestran que ratones a los que se administró dosis de genisteína equivalentes a las que recibieron los bebés demostraron una significativa incidencia de cánceres uterinos. Del mismo modo, los ratones que nacieron de madres a las que se les administraron inyecciones de genisteína tenían timos que pesaban solamente un 20% de lo que pesaban los controles (Yellayi y col. 2002).

Interacciones genético-ambientales

La observación de que una sustancia puede ser *teratogénica* en una cepa de ratón, pero no en otra sugiere firmemente que el efecto de una sustancia endógena tiene un componente genético sobre el desarrollo (véase cap. 22). Evidencia reciente sugiere que diferentes alelos en la población humana pueden influir si una sustancia es benigna o peligrosa para el feto. Por ejemplo, entre la población general, hay solamente un leve riesgo de que el fumar excesivamente por una madre pueda

causar malformaciones faciales en su feto. Sin embargo, si el feto tiene un alelo particular (A_2) del gen del factor de crecimiento TGF-β, el humo del tabaco absorbido a través de la placenta puede aumentar el riesgo de fisura del paladar y de paladar hendido (Shaw y col. 1996). Del mismo modo, el bajo peso al nacer en niños nacidos de madres fumadoras está asociado con polimorfismos particulares de dos genes que están involucrados en la metabolización de hidrocarbonos cíclicos (X. Wang y col. 2002). Diferentes alelos que codifican la enzima alcohol deshidrogenasa-2 resultan en diferentes capacidades para degradar el etanol. Si el consumo elevado de alcohol por parte de la madre lleva al síndrome alcohólico fetal o es un efecto alcohólico en el feto puede depender de los tipos de alcohol deshidrogenasa y de las isoenzimas aldehído deshidrogenasa en la madre y en el feto (McCarver-May 1996; Eriksson y col. 2001). Por lo tanto, si un compuesto es "teratogénico" o no lo es depende de muchas cosas, incluyendo los genes de los individuos expuestos a éste.

SITIO WEB 21.8 **Nuestro futuro robado (Our stolen future).** Este sitio web monitorea los efectos ambientales de los disruptores endocrinos. Éste es un sitio de política y de acción de consumo así como una cámara científica de compensación para la disrupción endocrina. El libro *Nuestro futuro robado* (*Our Stolen Future*) también proporciona conexiones hacia sitios web de personas que no están de acuerdo con ellos.

que las mujeres que tuvieron rubéola (sarampión alemán) durante el primer tercio de su embarazo tenían una posibilidad en 6 de dar a luz un niño con cataratas oculares, malformaciones cardíacas y sordera. Ésta fue la primera evidencia de que la madre no podía proteger completamente al feto del ambiente externo. Mientras más temprana es la infección de rubéola ocurrida durante el embarazo, mayor es el riesgo que el embrión sea malformado. Las 5 primeras semanas de desarrollo parecen ser las más críticas, debido a que es cuando se forman el corazón, los ojos y los oídos. La epidemia de rubéola de 1963-1965 en los Estados Unidos probablemente dio como resultado cerca de 10.000 muertes fetales y de 20.000 niños con anomalías del desarrollo (CDC, 2002b). Otros dos virus, el citomegalovirus y el virus herpes simple, también son teratogénicos. La infección por citomegalovirus de los embriones tempranos es casi siempre fatal, pero la infección tardía de los embriones puede llevar a ceguera, sordera, parálisis cerebral y retraso mental.

Las bacterias y los protistas raramente son teratógenos, pero dos de ellos pueden dañar a los embriones humanos. *Toxoplasma gondii*, un protista transportado por los conejos y los gatos (y sus heces), puede atravesar la placenta y causar defectos en el cerebro y en el ojo en los fetos. *Treponema pallidum*, la bacteria que causa la sífilis, puede matar a los fetos tempranos y producir sordera congénita y daño facial en los más viejos.

RADIACIÓN IONIZANTE. La radiación ionizante puede romper cromosomas y alterar la estructura del DNA. Por esta razón, se les dice a las mujeres embarazadas que eviten rayos X innecesarios, aunque no hay evidencia de anomalías congénitas que resulten de radiación por diagnósticos (Holmes 1979). El calor de una fiebre elevada también es un posible teratógeno.

Mientras que se conocen las causas de ciertas malformaciones, la mayoría de las anomalías congénitas todavía no puede ser explicada. Por ejemplo, las anomalías cardíacas congénitas se producen en cerca del 0,5-1% de todos los nacidos vivos. Las causas genéticas son responsables de cerca del 8% de estas anomalías cardíacas y cerca del 2% pueden ser explicadas por teratógenos conocidos. Esto deja sin explicación alguna al 90% de ellas (O'Rahilly y Müller 1992). Todavía hay mucha investigación por hacer.

SITIO WEB 21.9 **Otros agentes teratogénicos (Other teratogenic agents).** Ciertas drogas que modifican el comportamiento son teratogénicas, mientras que otras parecen no serlo. Estudios contradictorios debaten si la cafeína, el *cannabis* y la cocaína son teratogénicos.

SITIO WEB 21.10 **Efectos maternos sobre los adultos (Maternal effects on adults).** Los datos epidemiológicos recientes sugieren que el estrés nutricional en la madre embarazada puede predisponer en sus hijos a ciertas enfermedades cuando ellos sean adultos.

BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y MEDICINA DEL FUTURO

Terapias de cáncer basadas en el desarrollo

Cáncer como una enfermedad del desarrollo alterado

Muchos cánceres resultan de una acumulación de mutaciones que vuelven a introducir a algunas células en el ciclo celular y las hacen incapaces de responder a sus ambientes celulares (véase Lengauer y col. 1998; Sandberg y Chen 2002). Esta aproximación genética hacia la malignidad ha explicado la formación de numerosos tipos de tumores, pero ésta no es la historia completa. Como Folkman y col. (2000) observaron recientemente, la aproximación genética a la terapia del cáncer debe ser complementada por una aproximación del desarrollo que se ocupe de "la epigenética, de las interacciones célula-célula y extracelulares que también son fundamentales en la progresión de los tumores." En efecto, muchas células tumorales tienen genomas normales, y si son malignas o no lo son depende de su ambiente.

El más destacable de estos casos es el **teratocarcinoma**, que es un tumor de células germinales o de células

madre (véase cap. 19; Illmensee y Mintz 1976; Stewart y Mintz 1981). Los teratocarcinomas son crecimientos malignos de células que se asemejan a la masa celular interna del blastocisto de mamífero y que pueden matar al organismo. Sin embargo, si se coloca una célula de teratocarcinoma sobre la masa celular interna de un blastocisto de ratón, se integrará en el blastocisto, pierde su malignidad y se divide normalmente. Su progenie celular puede llegar a ser parte de numerosos órganos embrionarios. ¡Si su progenie formara parte de la línea germinal, se podrían formar espermatozoides o gametos femeninos desde la célula tumoral y transmitir su genoma a la siguiente generación (véase fig. 19-11)!

Los alrededores de la célula son críticos en la determinación de la malignidad. La división celular es una función "normal" de las células, y en muchos casos, se requieren las interacciones de tejidos para evitar que las células se dividan. Por lo tanto, hay tumores que se originan mediante defectos en la arquitectura tisular (Sonnenschein y Soto 1999, 2000; Bissel y col. 2002). Estudios recientes han demostrado que algunos tumores pueden ser causados por la alteración de la estructura del tejido y que estos tumores pueden en realidad ser suprimidos mediante la restauración de un ambiente tisular apropiado (Coleman y col. 1997; Weaver y col. 1997; Sternlicht y col. 1999). Muchos carcinógenos (agentes formadores de cáncer) no funcionan produciendo mutaciones. Por ejemplo, los asbestos causan cánceres y probablemente lo hacen perturbando a los tejidos, no a los genes.

Terapia de diferenciación

Carcinogénesis y teratogénesis son enfermedades de la organización del tejido y de la comunicación intercelular. Estudios recientes han demostrado que algunos defectos en las vías de señalización pueden causar cánceres, mientras que otros defectos en la misma vía pueden causar malformaciones. Mediante la comprensión de los acontecimientos de desarrollo involucrados, se pueden diseñar mejores terapias para estas enfermedades. Los meduloblastomas, los tumores cerebrales malignos más comunes en niños parecen ser debidos a anomalías de la vía de señalización de Hedgehog. En estos tejidos cerebrales, la proteína Smoothened es activada constitutivamente, debido a mutaciones en Patched (el regulador negativo normal de Smoothened) o a la metilación defectuosa del gen *Patched*. Berman y colegas (2002) demostraron que los meduloblastomas en ratones y en humanos pueden ser interrumpidos por ciclopamina, un teratógeno que funciona mediante el *bloqueo* de la vía de Hedgehog. Del mismo modo, se ha demostrado que el teratógeno ácido valproico reduce a varios tumores. Las mismas propiedades que hacen al ácido valproico un teratógeno pueden ser útiles para la destrucción de tejido tumoral (Blaheta y col. 2002).

El conocimiento de las vías de desarrollo también puede explicar la resistencia de algunos tumores a la quimioterapia convencional. Los melanomas, por ejemplo, son tumores de las células pigmentarias. Estudios recientes (McGill y col. 2002) han demostrado que MITF, además de activar a la tirosinasa y a otros genes que forman melanina (véase más adelante), también activan al gen antiapoptosis *BLC2*. Esto probablemente sea la causa de que los melanomas sean demasiado resistentes al tratamiento.

Otra área de la terapia de cáncer en la que la biología del desarrollo ha jugado un importante papel ha sido la "**terapia de diferenciación**" para la leucemia promielocítica aguda (LPA). En 1978, Pierce y col. observaron que las células cancerígenas estaban en muchos caminos de reversión hacia células embrionarias y postularon la hipótesis de que las células cancerígenas deberían revertir hacia la normalidad si se las hacía diferenciarse. El mismo año, Sachs (1978) descubrió que ciertas leucemias podían ser controladas al hacer que sus células se diferencien en lugar de proliferar. Una de estas leucemias es LPA, que es causada por una recombinación somática entre los cromosomas 15 y 17 en los precursores celulares que dan origen a los neutrófilos (véase fig. 15-21). La fusión de estos cromosomas crea un factor de transcripción quimérico, una de cuyas partes es el receptor-α del ácido retinoico. La expresión de este factor de transcripción quimérico hace que la célula se vuelva maligna (Miller y col. 1992; Grignani y col. 1998). Normalmente, el receptor-a del ácido retinoico está involucrado en la diferenciación de células precursoras mieloides hacia neutrófilos, pero el factor de transcripción quimérico parece impedir que esto ocurra. El tratamiento de los pacientes con LPA con ácido *trans-retinoico* causa la remisión de la LPA en más del 90% de los casos, debido a que el ácido retinoico adicional es capaz de llevar a cabo la diferenciación de las células leucémicas hacia neutrófilos normales (Hansen y col. 2000; Fontana y Rishi 2002).

El concepto de terapia de diferenciación ahora está siendo extendido a otros tipos de cánceres (véase Altucci y Gronemeyer 2001). Parece que las células tumorales pueden volverse "adictas" a las expresiones elevadas de los reguladores transcripcionales que estimulan su rápida división celular. Jain y col. (2002) han encontrado que una inactivación breve de los reguladores de crecimiento tal como Myc le dice a las células tumorales que se diferencien o mueran (fig. 21-18). Una pregunta importante, entonces, es cómo se consigue esa breve inactivación de los reguladores de crecimiento. La respuesta puede ser proporcionada por la tecnología de RNA de interferencia. Xia y col. (2002) demostraron la eficacia del mecanismo de liberación mediado por virus que provoca el silenciamiento específico de los genes blanco de interés mediante la expresión de un **RNA de interferencia pequeño (siRNA**; del inglés, *small interfering RNA*). Los vectores de adenovirus fueron utilizados para transfectar células tumorales con genes que codifican un pequeño transcrito antisentido dirigido a una región específica del gen de interés. Como resultado, la proteína codificada por este gen no fue traducida.

Inhibición de la angiogénesis

Otra área en la que el conocimiento del desarrollo puede contribuir a las terapias de cánceres es la inhibición de la angiogénesis. Judah Folkman (1974) ha estimado que en el cuerpo humano se producen tanto como 350 mil millones de mitosis cada día. Con cada división celular viene la posibilidad de que las células resultantes sean malignas. Aunque, en realidad, en cualquier individuo se desarrollan muy pocos tumores. Folkman ha sugerido que las células capaces de formar tumores se desarrollan con una cierta frecuencia, pero que en su mayor parte nunca son capaces de formar tumores observables. La razón es que

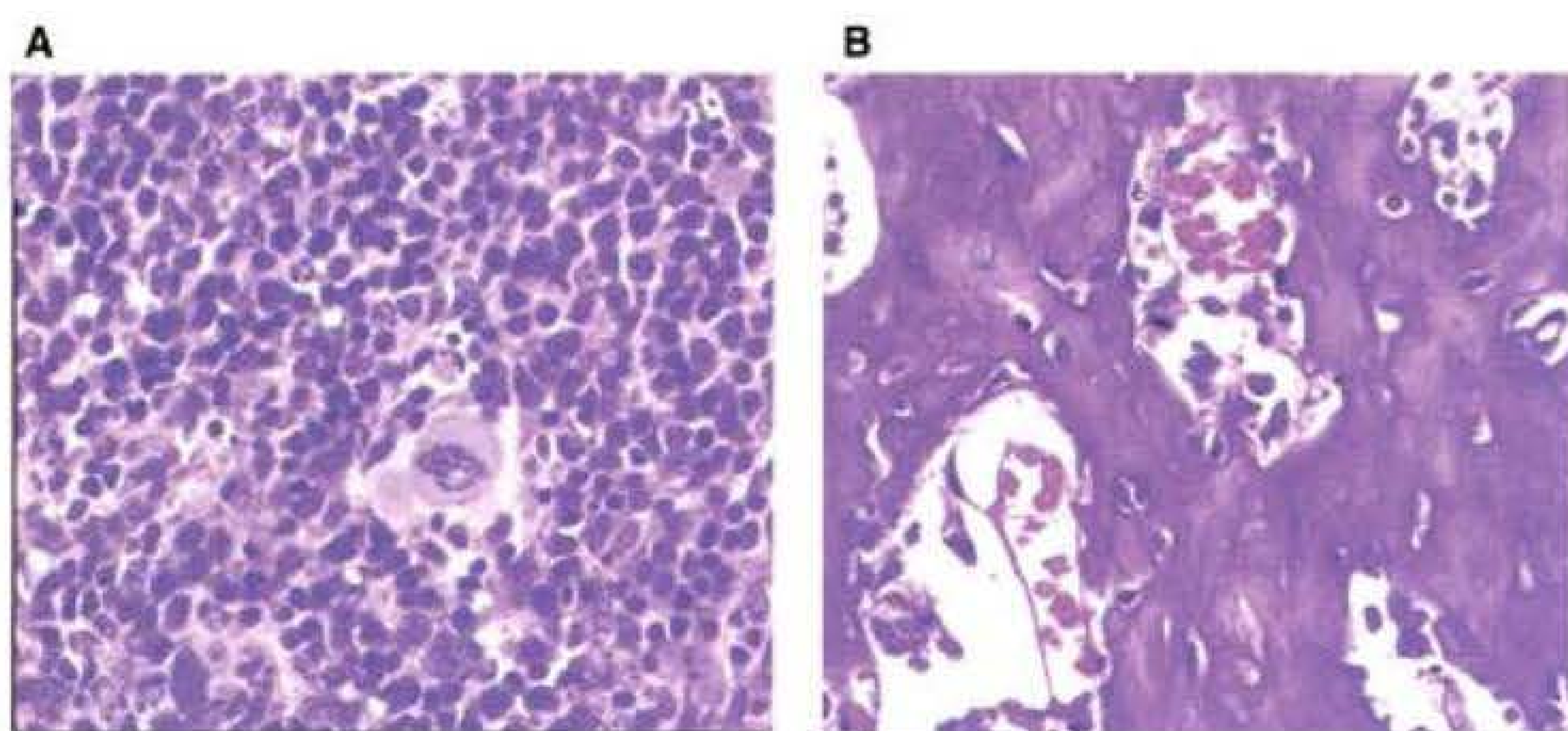


Fig. 21-18. Diferenciación de los sarcomas osteogénicos en ratones debido a la inactivación del factor de transcripción Myc. **A.** Los sarcomas osteogénicos inyectados en los ratones se mantuvieron indiferenciados y metastatizaron. **B.** Cuando fue bloqueada brevemente la transcripción del factor de transcripción Myc (que promueve la división celular), las células tumorales se diferenciaron a células tipo ósea maduras. (Según Jain y col. 2002.)

un tumor sólido, como cualquier otro tejido que se divide rápidamente, necesita oxígeno y nutrientes para sobrevivir. Sin un soporte sanguíneo, los tumores potenciales mueren o se mantienen latentes. Tales "microtumores" se mantienen como una población celular estable en la cual las células que mueren son reemplazadas por células nuevas.

El punto crítico en el que un nódulo de células cancerosas se vuelve un tumor de crecimiento rápido se produce cuando se vasculariza. Un microtumor puede expandirse hasta 16.000 veces su volumen original en dos semanas después de la vascularización. Sin embargo, sin aporte sanguíneo no se observa crecimiento (Folkman 1974; Ausprunk y Folkman 1977). Para llevar a cabo esta vascularización, los microtumores secretan sustancias denominadas **factores de angiogénesis tumoral.** Éstas frecuentemente incluyen los mismos factores que producen el crecimiento de los vasos sanguíneos en el embrión –EGF, FGF2, factor de crecimiento tipo placenta y otros. Los factores de angiogénesis tumoral estimulan la mitosis en las células endoteliales y dirigen la diferenciación celular hacia los vasos sanguíneos en la dirección del tumor.

La angiogénesis tumoral puede demostrarse mediante la implantación de una pieza de tejido tumoral dentro de las capas de una córnea de un conejo o de un ratón. La córnea en sí misma no está vascularizada, pero está rodeada por un borde vascular o limbo. El tejido tumoral induce la formación y crecimiento hacia el tumor de vasos sanguíneos (fig. 21-19; Muthukkaruppan y Auerbach 1979). Una vez que los vasos sanguíneos entran al tumor, las células tumorales experimentan un crecimiento explosivo, estallando finalmente el ojo. Otros tejidos sólidos adultos no inducen la formación de vasos sanguíneos. Por esta razón podría ser posible bloquear el desarrollo del tumor mediante el bloqueo de la angiogénesis. Folkman y sus colegas han sido los primeros en intentar hallar y usar inhibidores de la angiogénesis. El cuadro 21-3 enumera varios inhibidores de la angiogénesis naturales y artificiales. Estos compuestos actúan evitando que las células endoteliales respondan a la señal angiogenética del tumor.* Curiosamente, la talidomida, el teratógeno responsable de los defectos congénitos en la década de 1960 está en esta lista. La talidomida ha sido hallada como un potente factor antiangiogénesis que puede reducir el crecimiento de los cánceres en ratas y en ratones (D'Amato y col. 1994; Dredge y col. 2002). Una de las ventajas de estos compuestos es que es muy poco probable que las células tumorales evolucionen resistencia hacia ellos, debido a que la célula tumoral misma no es el blanco de estos agentes (Boehm y col. 1997; Kerbel y Folkman 2002).

Hanahan y Folkman (1996) han postulado que la angiogénesis tumoral está mediada por un cambio en el equilibrio entre los factores de angiogénesis y los inhibidores de angiogénesis. Las observaciones de la progresión de los tumores humanos y de los knockouts génicos en ratones sugieren que la angiogénesis tumoral puede ser mediada por una disminución en la producción de inhibidores de la angiogénesis o un incremento en la producción de factores de angiogénesis. La señal para nueva síntesis de VEGF en las células tumorales incluso podría ser la hipoxia que las células experimentan en el centro de una masa celular premaligna (Shweiki y col. 1992).

El cáncer no es solamente la enfermedad caracterizada por la angiogénesis ectópica. La destrucción de la retina en las personas con diabetes severa y en los niños prematuros probablemente es debida a VEGF inducido por hipoxia, que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos (véase Barinaga 1995).

El cáncer y las malformaciones congénitas son lados opuestos de la misma moneda. Ambas involucran disrupciones del desarrollo normal. Además, como se ha visto, los agentes que se sabe causan malformaciones congéntitas –talidomida, ácido retinoico y ciclopamina– pueden ser utilizados como drogas para impedir los cánceres. Así como ellos pueden alterar el desarrollo normal, también pueden alterar los rasgos característicos del desarrollo causados por las células tumorales.

Terapia génica

Las tecnologías de la terapia génica pueden darnos la capacidad para modificar genéticamente nuestros cuerpos (y los cuerpos de nuestros hijos) dentro de la próxima década. Sin embargo, la capacidad para insertar nuevos genes en un ovocito fecundado y la capacidad para producir células madre embrionarias humanas, han aumentado las preocupaciones de que el genoma podría ser manipulado. Algunas personas están deseando de ver el momento cuando las enfermedades genéticas podrían ser trata-

* El consumo de té verde ha sido asociado con baja incidencia de cáncer humano y con la inhibición del crecimiento de la célula tumoral en los animales de laboratorio. Cao y Cao (1999) han demostrado que el té verde, así como uno de sus componentes, epigalocatechina-3-galato (EGCG), evitan la angiogénesis inducida por FGF2 y VEGF.

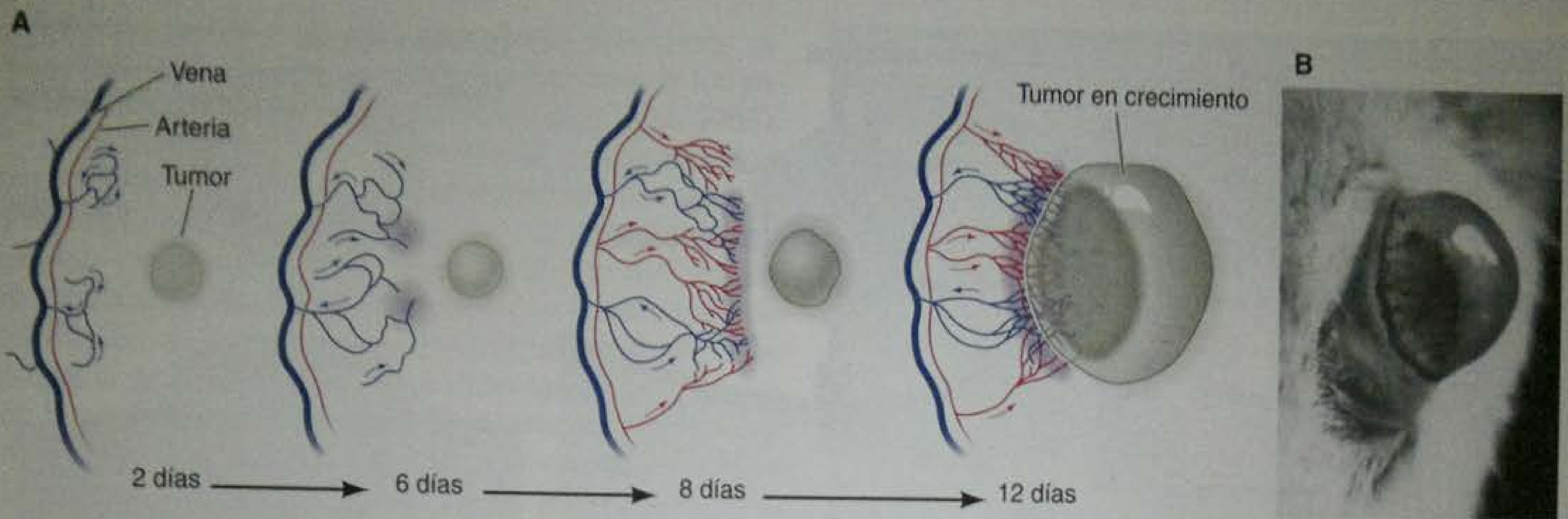


Fig. 21-19. Nuevos vasos sanguíneos crecen hacia el sitio del tumor mamario trasplantado hacia la córnea de un ratón albino. **A.** Secuencia de acontecimientos que llevan a la vascularización del tumor en los días 2, 6, 8, y 12. Las venas y las arterias en el limbo que rodean la córnea aportan los vasos sanguíneos para el tumor. **B.** Fotografía de una córnea viva de un ratón albino, con nuevos vasos sanguíneos que, desde el limbo, se aproximan al injerto tumoral. (De Muthukkaruppan y Auerbach 1979; fotografía cortesía de R. Auerbach.)

das por terapias génicas y eliminadas de las subsiguientes generaciones. A otras personas (y en algunos casos, las mismas personas) les preocupa que la capacidad para manipular los genes pueda resultar en erróneos intentos para mejorar las capacidades físicas o mentales humanas.

Terapia génica de la célula somática

La terapia génica de la célula somática creó expectativas de curación de las enfermedades genéticas de las personas mediante la inserción de un gen tipo salvaje que debería ser activado en tiempos y lugares apropiados. Este tipo de terapia génica está siendo estudiada en cerca de 600 laboratorios (Roberts 2002). En tales experimentos, se cultiva una célula madre comprometida (como la célula madre sanguínea o la célula madre hepática), a la que se le da un nuevo gen y se la reinserta en el cuerpo (Anderson 1998; Gage 1998; Ye y col. 1999). El nuevo gen generalmente está empaquetado en un vector lipídico o viral que le permite a éste ingresar en la célula y ser transcrito (fig. 21-20). Esta técnica fue utilizada en el estudio sobre el RNA de interferencia pequeño mencionado antes.

Se han producido sensacionales éxitos en este campo, así como algunos fracasos importantes. En 1990, W. French Anderson y sus colegas (Blaese y col. 1995; Onodera y col. 1998) trataron a varios pacientes que estaban padeciendo de inmunodeficiencia debido a una mutación

Cuadro 21-3 *Algunos inhibidores naturales y artificiales de la angiogénesis*

Compuesto	*Mecanismo de acción*
Angiostatina	Unión a la ATP sintetasa, angiomotina y anexina II sobre las células endoteliales; inhibe la proliferación y migración de la célula endotelial
Bevacizumab (Avastina)	Anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
Arresten	Se cree que se une a la integrina $\alpha_5\beta_3$; inhibe la proliferación celular endotelial, la migración, la formación de tubos y la neovascularización
Canstatina	Se cree que se une a la integrina $\alpha_5\beta_3$; inhibe la proliferación celular endotelial, la migración, y la formación de tubos
Combretastatina	Dirigida contra los microtúbulos; induce la reorganización del citoesqueleto de actina y el abombamiento temprano de la membrana celular en las células endoteliales humanas
Endostatina	Se cree que se une a la integrina $\alpha_5\beta_3$; inhibe la proliferación celular endotelial y la migración. Puede inducir apoptosis de las células endoteliales en proliferación
NM-3	Inhibe a VEGF; se ha demostrado que inhibe selectivamente la proliferación de las células endoteliales, la brotación y la formación de tubos in vitro
Talidomida	Inhibe la angiogénesis mediada por FGF-2 y VEGF
Tumstatina	Se une a la integrina $\alpha_5\beta_3$; inhibe la proliferación celular endotelial y la neovascularización
2-Metoxiestradiol	Inhibe la formación de microtúbulos en las células endoteliales en proliferación, que resulta en la apoptosis endotelial
Vitaxina	Anticuerpos monoclonales humanizados contra integrina $\alpha_5\beta_3$

Fuente: Según Kerbel y Folkman 2002.

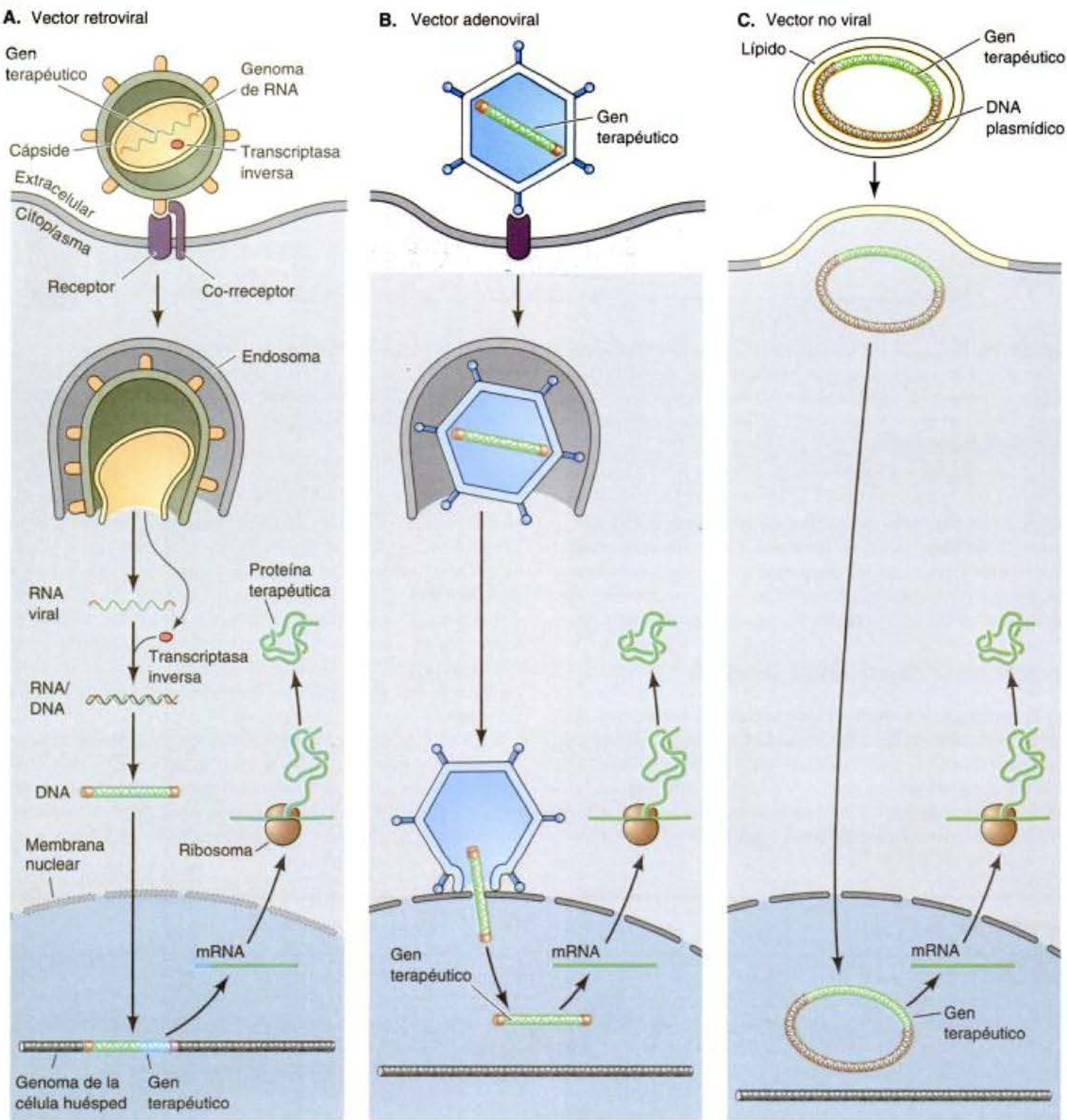


Fig. 21-20. Vectores utilizados en terapia génica. **A.** Cuando un gen (verde) se coloca en un vector retroviral, el virus es tomado hacia la célula y libera su RNA en la célula. La transcriptasa inversa del virus copia un DNA de doble cadena desde el RNA y este DNA se integra en el genoma del huésped. El gen insertado puede luego ser transcrito. **B.** El genoma del adenovirus es, en realidad, una doble cadena de DNA. Este vector se libera de su propia envoltura sobre la envoltura nuclear de la célula huésped. Los genes que éste lleva luego pueden ser expresados sin ser incorporados en el genoma huésped. **C.** El DNA insertado en una membrana lipídica debe ser insertado artificialmente en la célula huésped. Sin embargo, una vez en la célula huésped, el DNA puede entrar en el núcleo del huésped y transcribirse. (Según Eck 1999.)

en su gen adenosina deaminasa (ADA). Sus propias células T (que carecen de la enzima ADA) fueron transfectadas con un gen ADA tipo salvaje empaquetado en un retrovirus. Estos pacientes se volvieron inmunocompetentes, aunque todavía tienen que regresar por tratamiento. La terapia génica de células somáticas también ha sido utilizada exitosamente para tratar las enfermedades hepáticas genéticas y la hemofilia (Roth y col. 2001). Sin embargo, en 1999, un paciente adulto que experimentó terapia génica para un defecto enzimático específico del riñón murió 4 días después del tratamiento. La causa de esta muerte sigue siendo un misterio, pero es posible que el vector adenoviral estimulara una reacción alérgica que cerró los pulmones del paciente. Del mismo modo, un

prometedor estudio dirigido contra otra deficiencia inmune heredada fue interrumpido cuando uno de los pacientes desarrolló síntomas tipo leucemia (Check 2002).

La terapia génica de la célula somática es similar a un tratamiento médico estándar por medio del cual se trata a un *individuo*, de modo tal que los aspectos éticos que origina son similares a los involucrados en los ensayos de cualquier nueva droga humana o en el procedimiento quirúrgico en las economías dominadas por el mercado. Algunas de las preocupaciones públicas están centradas en la posibilidad de las mejoras genéticas de los individuos. Hay una línea muy delgada entre el tratamiento y la mejora. Los mismos tratamientos que pueden curar enfermedades genéticas y cánceres también pueden ser utilizados para alterar los fenotipos de los individuos "normales". Por ejemplo, la inserción de ciertos genes en los músculos puede dar a los receptores una fuerte musculatura o hacerlos menos propensos a experimentar fatiga muscular. Si se encontraran genes que pudieran hacer a las personas vivir más tiempo o conservar su inteligencia o su memoria por más tiempo; ¿se les debería dar a los que pueden pagar tales tratamientos? ¿La calvicie, la baja estatura y la obesidad leve son enfermedades, o solo son condiciones que nuestra sociedad ha definido como subóptimas? Las respuestas a estas preguntas podrían ser críticas para el éxito comercial de la ingeniería genética.



Fig. 21-21. ANDi (al revés para "DNA insertado," del inglés, inserted DNA), un mono rhesus transgénico. El gen para la proteína fluorescente verde está presente en cada uno de sus núcleos.

Terapia génica de la línea germinal

En contraste con la terapia génica de la célula somática, que intenta curar a los individuos, la **terapia génica de la línea germinal** intenta eliminar genes "malos" del individuo y de los descendientes de esta persona. La terapia génica de la línea germinal puede ser llevada a cabo de dos modos: 1) mediante la modificación de una célula germinal o de un cigoto (gameto femenino fecundado) de modo tal que el nuevo genoma está en cada una de las células del cuerpo del individuo y es por está razón transferido a la siguiente generación a través de las células germinales, o 2) mediante la modificación de las células madre embrionarias y la generación de un cuerpo que contiene un elevado índice de células derivadas de estas blastómeras alteradas genéticamente.

En la última década, rutinariamente se han agregado, sustraído y reemplazado genes en ratones (véase cap. 5). Hay pocas dudas que tales procedimientos podrían hacerse en humanos si se deseara hacerlo. Ya ha nacido un mono rhesus transgénico portador del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) en cada una de las células del cuerpo (fig. 21-21; Chan y col. 2001). Se inyectó un vector retroviral que transporta el gen de GFP en el espacio entre el ovocito y la zona pelúcida. El retrovirus se insertó por sí mismo en el DNA del cigoto y el mono que se desarrolló desde este cigoto tenía este gen (de la medusa) en todas sus células.

La terapia génica de la línea germinal dio lugar a muchos aspectos éticos y sociales. En un simposio sobre Ingeniería del genoma humano, James D. Watson fue explícito acerca del uso de las técnicas de terapia génica para mejorar al humano: "Yo creo, que si podemos hacer mejores seres humanos sabiendo cómo agregar genes, ¿por qué no deberíamos hacerlo?" (Stock y Campbell 1998). Los críticos y comentaristas (Haraway 1997; Silver 1997; Rifkin 1998; Fukuyama 2002) afirmaron que si esta tecnología fuera exitosa, podría resultar en una gran desigualdad entre los ricos y los pobres. Aquellos que pudiesen pagarse la terapia génica podrían tener niños "más lindos," más sanos y quizás incluso más inteligentes. Aquellos que no pudiesen pagarlo quedarían fuera de este futuro brillante. Por lo tanto, la ingeniería genética de la línea germinal puede agravar la estratificación social, convertir las diferencias económicas hacia un tipo biológico y crear una subclase genética marginal.* Además, los que hoy se piensa como una "buena" característica genética podría no ser tan buena en un ambiente futuro.

También hay aspectos científicos que podrían mediar contra el éxito de la terapia génica de la línea germinal. Uno de éstos tiene de que ver con la posibilidad que la introducción de un nuevo gen pueda generar un knockout de un gen previamente funcional. Los mecanismos de inserción viral pueden preferir empalmar vectores virales dentro de los genes en lugar de hacerlo en las regiones de DNA no codificante (Schröder y col. 2002). El gen *inversion of embrionic turning* (cap. 22) fue descubierto cuando Yokoyama y col. (1993) hicieron sin darse cuenta el knockout de este gen mediante la inserción de un transgén en un embrión de ratón.

* Si esto parece ciencia ficción, cabe recordar que los científicos han clonado con éxito varias especies de mamíferos; algo que fue ciencia ficción hasta 1997.

SITIO WEB 21.11 **Bioética: mejora genética (Bioethics: Genetic enhancement).** Las perspectivas de la terapia génica de la línea germinal han provocado numerosas preocupaciones éticas. Este sitio web incluye un capítulo dedicado a las discusiones en esta área.

Células madre y clonado terapéutico

Clonado

El clonado de mamíferos fue descrito en el capítulo 4. La clonación de grandes mamíferos tiene aplicaciones en la agricultura y la capacidad para clonar animales transgénicos que producen grandes cantidades de proteínas humanas tiene importantes aplicaciones en la medicina (véase Di Berardino 2001). Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 4, los mamíferos clonados no son frecuentemente animales sanos. Hay muchas razones para el desarrollo anormal de los animales clonados, incluyendo la activación defectuosa de genes con impronta, la falla de modificaciones de histonas y las deficiencias de la metilación (Wilmut y col. 2002). La tecnología de micromatriz (Humphreys y col. 2002) ha documentado que los ratones clonados tienen patrones anormales de expresión génica en muchos de sus órganos. Uno de los genes más importantes para el establecimiento de la pluripotencialidad, el gen *Oct4*, es expresado de manera anómala en el blastocisto de la mayor parte de los clones de ratón hechos mediante transferencia nuclear somática y el patrón de inactivación del cromosoma X es anómalo en las vacas clonadas (Boiani y col. 2002; Xue y col. 2002).

La clonación no parece ser una buena técnica reproductiva para los seres humanos. Como Hans Schöler (citado en Glausiusz 2002) ha observado: "Para obtener un organismo normal, se tiene que pavimentar el camino con numerosas muertes o fetos malformados." Como se mencionó en el capítulo 4, Ian Wilmut, la persona a cargo del grupo que clonó la oveja Dolly, tiene similares puntos de vista negativos con relación a la clonación reproductiva humana. Sin embargo, algunas tecnologías de clonación pueden hallar importantes aplicaciones en el "clonado terapéutico" debido a que generan células madre, en lugar de nacidos vivos.

SITIO WEB 21.12 **Bioética: la ética de la clonación humana (Bioethics: The ethics of human cloning).** ¿Cuándo, si fuera posible, debería permitirse el clonado reproductivo de seres humanos?

Clonado terapéutico y células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (células ME) son pluripotentes, pueden ser cultivadas indefinidamente en un estado indiferenciado y conservan su potencial de desarrollo después de cultivos prolongados (véase cap. 4). Actualmente, las células ME humanas pueden obtenerse mediante dos técnicas principales (fig. 21-22A,B). En primer lugar, pueden ser derivadas de la masa celular interna de embriones humanos, como los que sobran de la técnica de fecundación in vitro (Thomson y col. 1998; véase antes). En segundo lugar, pueden ser generadas desde células germinales derivadas de fetos de aborto espontáneo (Gearhart 1998). En ambos casos, las células madre embrionarias son pluripotentes, debido a que son capaces de diferenciarse en cultivo para formar tipos de células madre más restringidas. Otros métodos para la obtención de células madre están en estadios experimentales (fig. 21-22C,D).

La importancia de las células madre pluripotentes en medicina es potencialmente enorme. La esperanza es que las células madre embrionarias humanas puedan ser utilizadas para producir nuevas neuronas para las personas con trastornos cerebrales degenerativos (como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson) o con daño de la médula espinal, para producir un nuevo páncreas para las personas con diabetes o para producir nuevas células sanguíneas para las personas con anemias. En las personas con corazones deteriorados se podría reemplazar el tejido dañado con nuevas células cardíacas y aquellos que están afectados de enfermedades inmunes pueden ser capaces de reponer su sistema inmune defectuoso. Tales terapias ya han funcionado en ratones. Las células madre embrionarias murinas han sido cultivadas bajo condiciones que las llevan a formar células secretoras de insulina, células madre musculares, células madre gliales y células madre neurales (fig. 21-23A,B; Brüstle y col. 1999; McDonald y col. 1999). Se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas derivadas de las células madre embrionarias reducen significativamente los síntomas de la enfermedad de Parkinson en roedores (Bjorklund y col. 2002; Kim y col. 2002).

Las células madre embrionarias humanas se diferencian en algunos aspectos desde su contraparte murina en sus requerimientos de crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los aspectos, tiene similar, si no idéntica, pluripotencialidad. Como en las células madre embrionarias de ratón, las células madre embrionarias humanas pueden ser dirigidas hacia vías específicas del desarrollo. Por ejemplo, Kaufman y col. (2001) dirigieron células madre embrionarias humanas para convertirse en células madre formadores de sangre al colocarlas sobre médula ósea de ratón o células endoteliales. Estas células madre hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias se pueden diferenciar a numerosos tipos de células sanguíneas (fig. 21-23C).

Una gran diferencia entre la experimentación en seres humanos y en ratón es que los ratones pueden ser endogámicos y genéticamente idénticos, pero no los seres humanos. Además, cuando las células madre embrionarias humanas se diferencian, expresan significativas cantidades de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad que pueden provocar rechazo inmune (Drukker y col. 2002). Para resolver el problema del rechazo del huésped, se pueden modificar las células madre embrionarias humanas o se puede utilizar la transferencia nuclear somática para asegurar que las células madres son genéticamente idénticas a la persona que debería haber recibido su progenie. Esto nos lleva a otra vía potencial de obtención de células madre embrionarias: el **clonado terapéutico** (véase fig. 21-22D). En esta técnica, un núcleo del paciente es insertado en un ovocito enucleado (como en la clonación). El embrión obtenido crece in vitro hasta que ha desarrollado una masa celular interna.

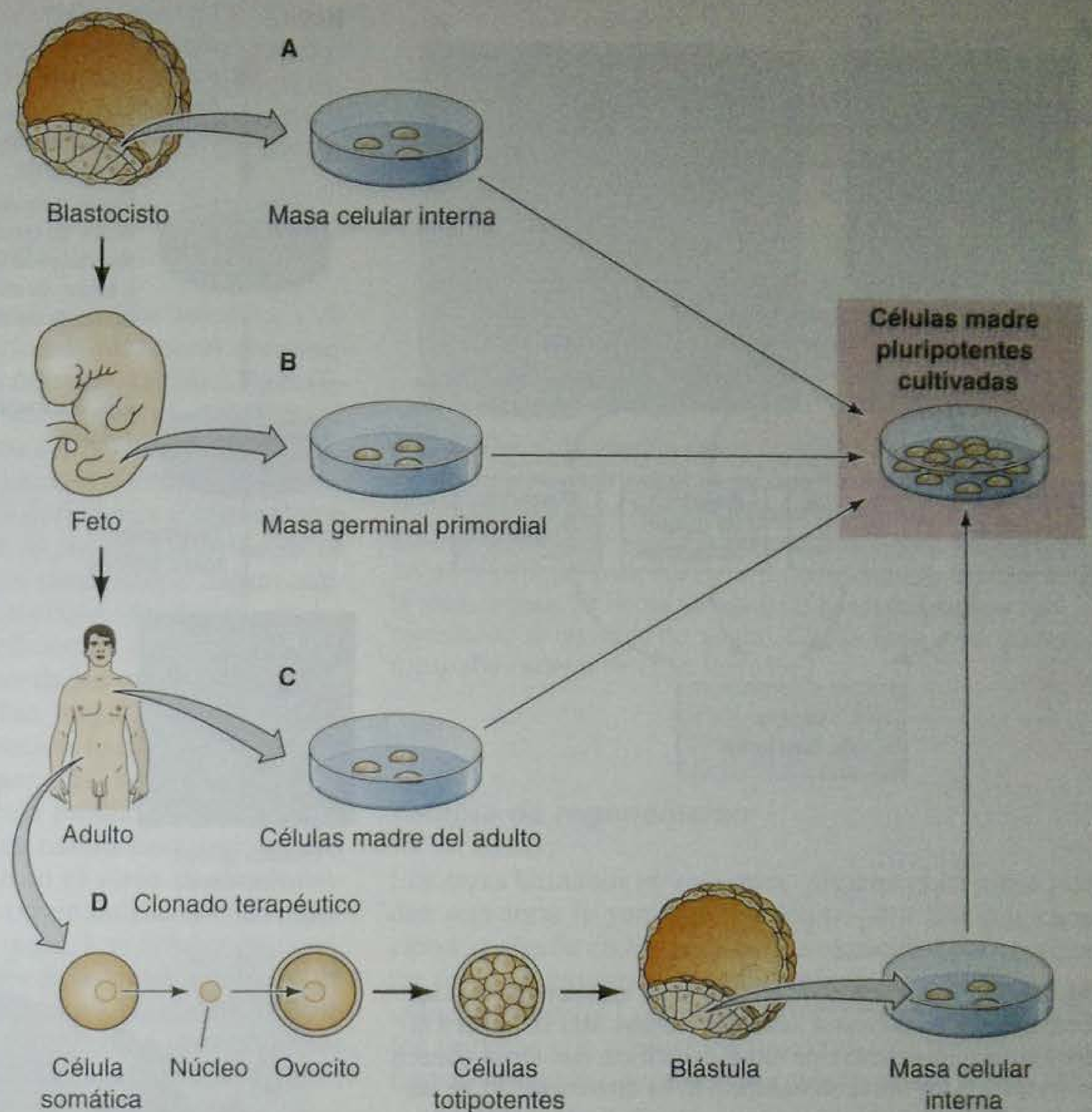


Fig. 21-22. Cuatro modos principales de obtención de células madres pluripotentes humanas. Se ha documentado que los métodos A y B funcionan; los métodos C y D siguen siendo experimentales. **A.** Las células desde la masa celular interna de un blastocito son cultivadas y se vuelven células madre embrionarias pluripotentes. **B.** Las células germinales primordiales de un feto son recolectadas y se vuelven células madre embrionarias pluripotentes. **C.** Se obtienen las células madre del adulto y éstas crecen de un modo que les permite convertirse en pluripotentes. **D.** "Clonado terapéutico," por medio del cual el núcleo de una célula somática es transferido hacia un ovocito enucleado. El ovocito es activado y da origen al blastocisto, cuya masa celular interna es recolectada y cultivada para convertirse en células madre embrionarias pluripotentes. (Según NIH 2000.)

Las células de la masa celular interna luego son cultivadas para generar células madre que son genéticamente idénticas al paciente. En el clonado terapéutico (a veces denominado "trasplante nuclear somático"), el resultado es la producción de células madre, no es la producción de un nuevo niño. Mientras que la mayoría de las organizaciones biológicas y médicas no recomienda el clonado reproductivo, sí está a favor del clonado terapéutico. Esta distinción ha llevado a debates que abarcan los principales aspectos sociales.

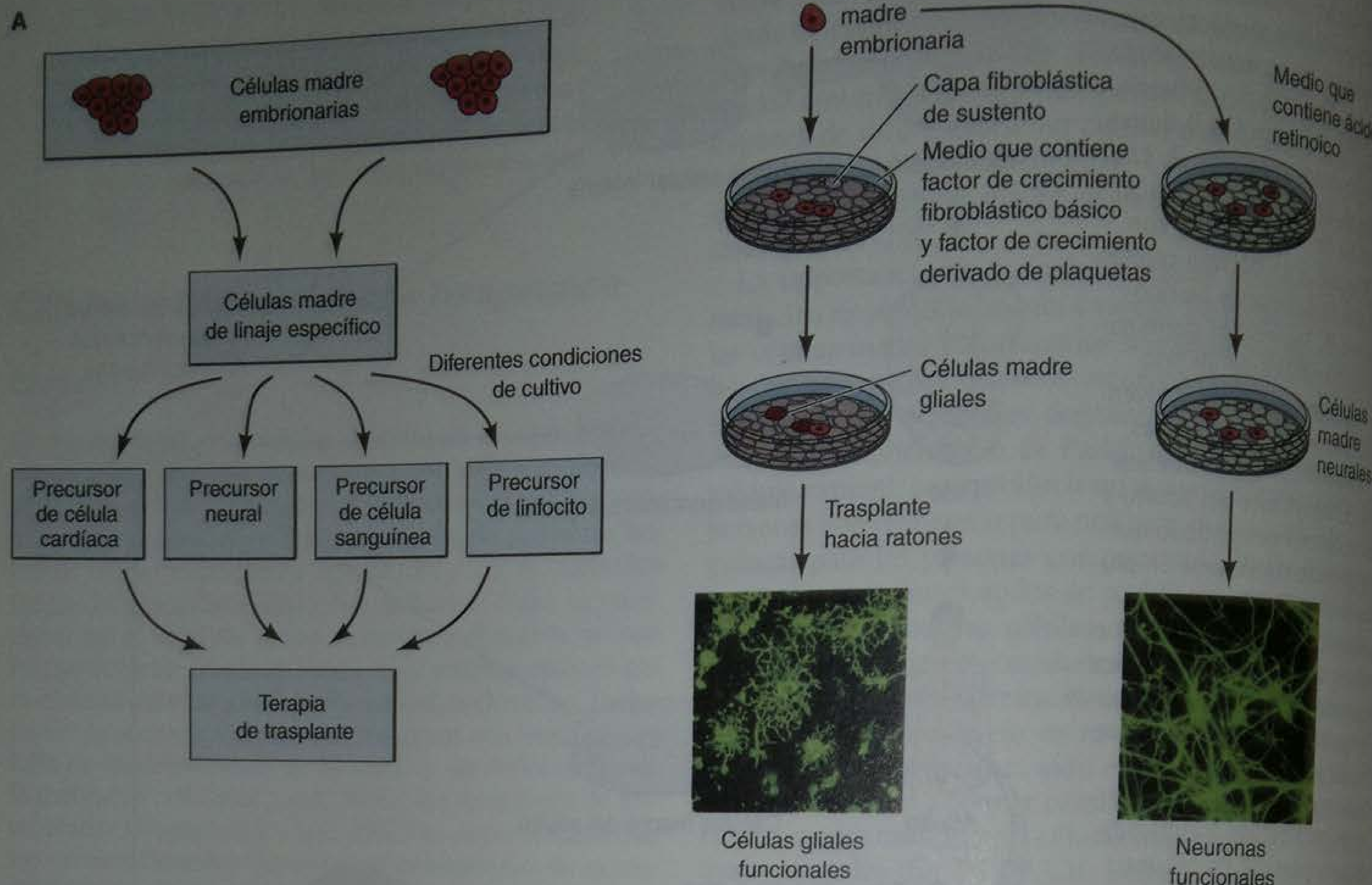
SITIO WEB 21.13 **Bioética: ¿cuándo comienza la vida humana? (Bioethics: When does human life begin?).** Los científicos han proporcionado varias respuestas a esta pregunta, según si se privilegia el genoma, el individuo o el sistema nervioso como el sine qua non de la vida humana.

SITIO WEB 21.14 **Bioética: ética y políticas científicas sobre las células madre (Bioethics: Stem cell science ethics and politics).** Diferentes naciones albergan diferentes ideas sobre si es moral o conveniente estudiar las células madre embrionarias humanas. Hay sitios que examinan los actuales debates sobre si las células madre adultas son pluripotentes y cómo debería o no ser utilizada la terapia de las células madre.

Células madre adultas

Como se mencionó inicialmente en este libro, numerosos órganos contienen células madre multipotentes, incluso en el adulto. Las células madre multipotentes pueden dar origen a un grupo limitado de tipos tisulares del adulto. Hay varias razones por las que no es tan fácil utilizar a las células madre embrionarias pluripotentes. En primer lugar, ellas parecen tener un índice de división celular relativamente bajo y no proliferan fácilmente. En segundo lugar, son difíciles de aislar y frecuentemente se aísla menos de una de cada mil células en un órgano. Sin embargo, cuando los investigadores han sido capaces de aislar y cultivar a estas células, han demostrado ser muy útiles (véase fig. 21-22C). Carvey y col. (2001) han demostrado que cuando las células madre neurales del mesencéfalo de las ratas adultas son cultivadas en una mezcla de factores paracrinos, incluyendo interleucina-1 e interleucina-11, se diferencian a neuronas dopaminérgicas que pueden curar la versión de la enfermedad de Parkinson de la rata. Además, los investigadores también hallaron formas para mejorar selectivamente la proliferación de células madre particulares en cultivo (Wu y col. 2002).

Es polémico si las células madre multipotentes se convierten en pluripotentes. Aparentemente la mayor parte (si no todas) de las células madre multipotentes adultas están restringidas para formar solamente unos pocos tipos celulares (Wagers y col. 2002). Cuando las células



C

Fig. 21-23. Terapéuticas de célula madre embrionaria. **A.** Las células madre embrionaria humanas (células ME) se pueden diferenciar a células madre de linaje específico, que luego pueden ser trasplantadas hacia un huésped. **B.** La diferenciación de las células ME de ratón hacia células madre de linaje restringido (neuronal y glial) puede ser llevada a cabo mediante la alteración del medio en el que las células ME crecen. **C.** Células sanguíneas que se desarrollan desde células madre embrionarias humanas cultivadas sobre la médula ósea de ratón. (A, según Gearhart 1998; B, fotografías de Brüstle y col. 1999 y Wickelgren 1999, cortesía de O. Brüstle y J. W. McDonald; C, fotografía cortesía de la Univesidad de Wisconsin.)

madre hematopoyéticas son marcadas con proteína fluorescente verde (GFP) y colocadas en el ratón, sus descendientes marcados fueron hallados en toda la sangre de estos animales, pero no en cualquier otro tejido.

Sin embargo, algunos científicos afirman que bajo algunas condiciones de cultivo, las células madre multipotentes son capaces de generar progenies que pueden producir muchos tipos celulares diferentes. Jiang y col. (2002a) aislaron una población de células madre de la médula ósea del ratón que, cuando eran inyectadas en los ratones adultos, daban origen a células sanguíneas (como se esperaba), pero también a células neurales y a células endodérmicas (fig. 21-24). LaBarge y Blau (2002) han demostrado que estas células también pueden convertirse en células musculares. Cuando se marcó médula ósea de ratón con proteína fluorescente verde y se la trasplantó a ratones receptores, se halló GFP en las subsiguientes células madre de músculo y posteriormente (después de un trauma en los músculos), en los miocitos maduros. Estas **células madre mesenquimáticas** tenían otras capacidades inesperadas: fueron capaces de integrarse en la masa celular interna de un blastocisto y expresaron *Oct4* -tal como las células madre embrionarias. Este tipo de célula madre ha sido hallada entre las células madre de la médula ósea de humanos (Jiang y col. 2002b; Korbling y col. 2002). Cuando se tomaron biopsias de individuos que habían recibido trasplantes de células madre hematopoyéticas, se hallaron hepatocitos y células de la piel derivados de las células donantes. Estas células pueden representar una población extremadamente pequeña de células madre que persiste en la vida adulta, o ellas podrían ser normalmente células madre multipotentes específicas de órganos que, bajo condiciones de cultivo, recuperan la pluripotencialidad. Otros investigadores han criticado estos hallazgos diciendo que las células madre no contribuyen a ningún tejido nuevo. En su lugar, las células madre adultas se fusionan con células existentes importando de este modo su tinción a una célula hepáti-

ca o muscular que ya existía (Terada y col. 2002; Ying y col. 2002). Esta importante pregunta de si las células madre pueden llegar a ser pluripotentes se mantiene abierta. La investigación en células madre embrionarias y adultas ha producido sorpresas continuamente y un inesperado grupo de observaciones.

Células madre transgénicas

La combinación de la tranferencia nuclear somática y de la terapia génica puede ser utilizada para curar enfermedades genéticas que afectan a órganos o tejidos específicos. Por ejemplo, los ratones deficientes en el gen *Rag2* son incapaces de recombinar su DNA para producir anticuerpos. Rideout y col. (2002) tomaron células del extremo de la cola de ratones *Rag2*-deficientes e implantaron los núcleos de aquellas células en ovocitos enucleados de ratón (fig. 21-25). Los ovocitos renucleados fueron activados y dieron origen a blastocistos, desde las células madre embrionarias *Rag2*-deficientes que habían sido cultivadas. Uno de los mutantes de los genes *Rag2* en las células madre embrionarias fue luego convertido a un gen tipo salvaje por recombinación homóloga. A las células madre embrionarias "reparadas" se las hizo crecer, se las marcó y se las cultivó para producir células madre hematopoyéticas. Estas células madre hematopoyéticas fueron inyectadas nuevamente en el ratón de donde habían sido tomados los núcleos originalmente y ellas repoblaron el sistema inmune del ratón. Las células que producen anticuerpos maduros fueron detectables dentro de un mes de haber sido trasplantadas. Recientemente, se han producido células madre embrionarias humanas transgénicas (Zwacka y Thompson 2003.)

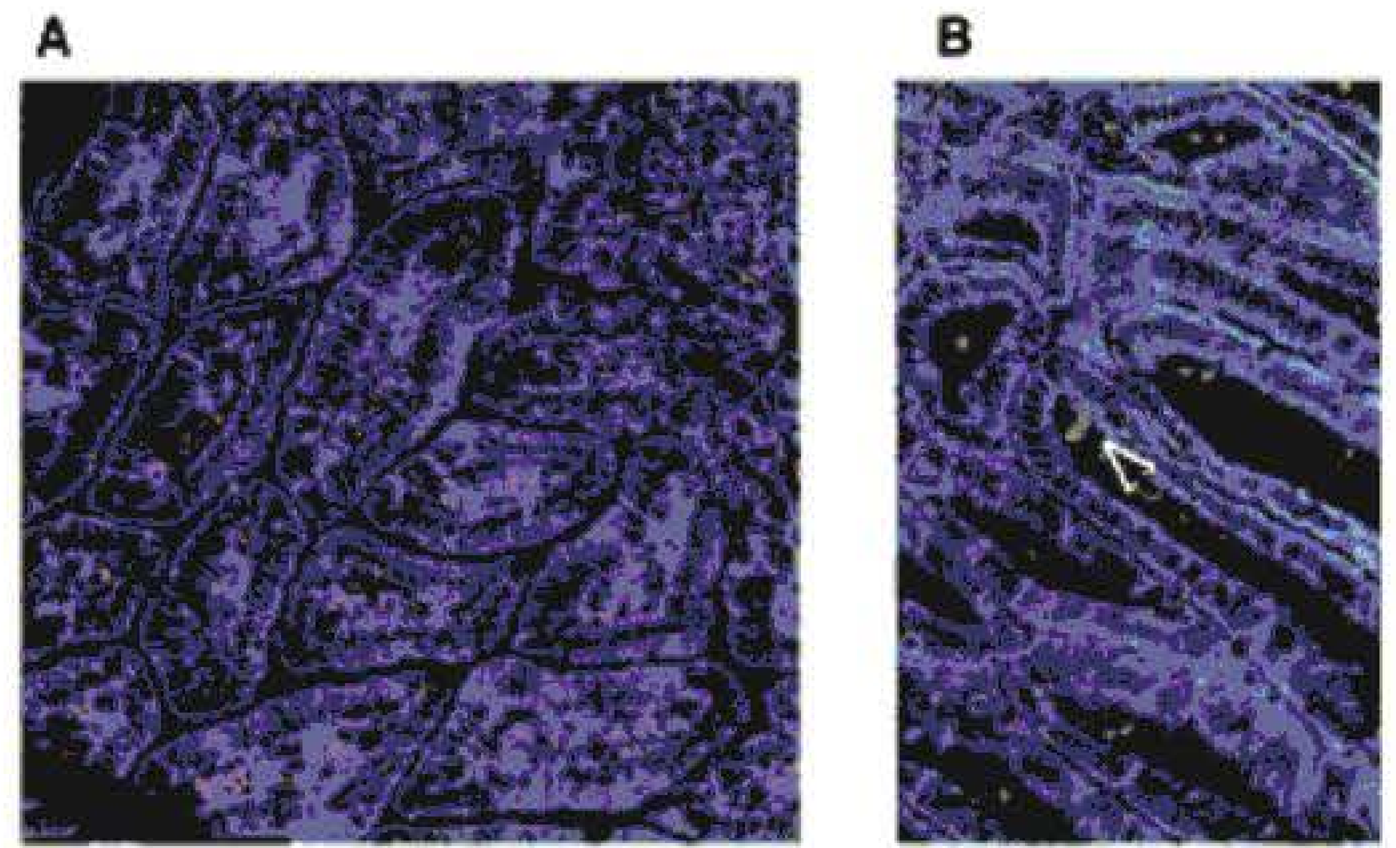


Fig. 21-24. Colonización de los órganos adultos por las células madre mesenquimáticas de la médula ósea. Intestinos de **A**, un ratón control y **B**, un ratón inoculado con células madre mesenquimáticas. El verde indica la presencia de la proteína β-galactosidasa utilizada para marcar a las células mesenquimáticas de la médula ósea. La flecha señala unas pocas células que han contribuido al intestino del adulto. (Según Jiang y col. 2002a; fotografía cortesía de C. M. Verfaillie.)

Terapia de regeneración

Los seres humanos no regeneran órganos. Los niños pueden regenerar la yema de los dedos, pero aun esta capacidad se pierde en los adultos. La capacidad para regenerar órganos humanos dañados debería constituir una revolución médica. Los investigadores han intentado hallar los caminos que activan los programas de desarrollo que fueron utilizados durante la organogénesis en el adulto.

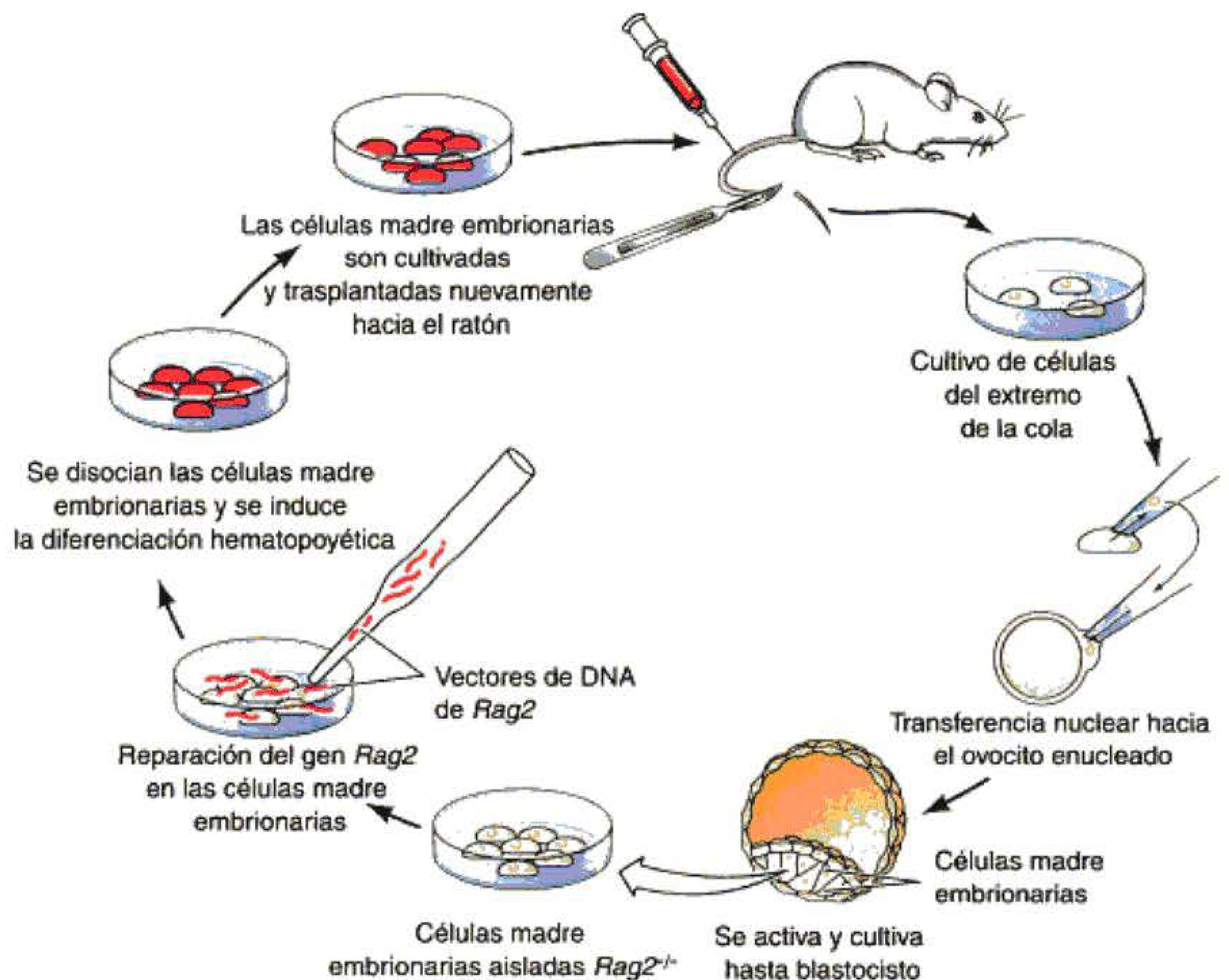


Fig. 21-25. Reparación de la deficiencia de *Rag2* por clonado terapéutico. Las células del extremo de la cola de un ratón deficiente de *Rag2* ($Rag2^{-/-}$) son cultivadas y los núcleos de estas células somáticas son trasplantados hacia ovocitos enucleados activados. Los ovocitos se desarrollan hacia el estadio de blastocisto y las células de la masa celular interna *Rag2*-deficientes son aisladas y crecen como células madre. Cuando estas células madre son incubadas con DNA *Rag2* tipo salvaje, la recombinación homóloga permite que algunas células reemplacen el alelo mutante con un alelo tipo salvaje. Las células madre embrionarias reparadas son agregadas, marcadas con un gen GFP y cultivadas de una manera que las dirige a diferenciarse a células madre hematopoyéticas y linfocíticas. Cuando estas células son inyectadas hacia un ratón, pueden restaurar su sistema inmune al producir células *Rag2* positivas que pueden generar anticuerpos.



Fig. 21-26. Formación de hueso desde la matriz de colágeno que contiene plásmidos que llevan la hormona paratiroidea humana. **A.** Se hizo un espacio de 1,6 cm en un fémur de perro y se lo estabilizó con tornillos. Se colocó sobre los bordes de la fractura un gel que contenía plásmido. Las radiografías del área a las 2, 8, 12, 16 y 18 semanas después de la cirugía muestran la formación de un puente óseo en el espacio a las 18 semanas. **B.** Fractura control (sin plásmido en el gel) a las 24 semanas. **C.** Hueso entero un año después de la cirugía, que muestra la región reparada. (Según Bonadio y col. 1999; fotografías cortesía de J. Bonadio.)

Una opción para este programa de investigación es la investigación mencionada anteriormente para las células madre adultas que todavía se encuentran relativamente indiferenciadas, pero que pueden formar tipos celulares particulares si se les da el ambiente apropiado. La segunda opción es investigar los ambientes que permitirán a tales células iniciar la formación de células y de órgano. Se analizarán dos de estos esfuerzos médicos.

REGENERACIÓN ÓSEA. Mientras que los huesos fracturados pueden cicatrizar, las células óseas en los adultos generalmente no regeneran para tender un puente en el amplio hueco. El hallazgo de que los mismos factores paracrinos y endocrinos que están involucrados en la osificación endocondral también están involucrados en la reparación de la fractura (Vortkamp y col. 1998) incrementó la posibilidad de que el nuevo hueso pueda crecer si se proporcionaban los factores paracrinos y el ambiente extracelular apropiados. El problema es cómo liberar estos compuestos en una localización en particular durante un largo período.

Una solución al problema de la liberación fue ideado por Bonadio y sus colegas (1999), quienes desarrollaron un gel de colágeno que contiene plásmidos que transportan el gen de la hormona paratiroidea humana. Los plásmidos impregnados al gel fueron colocados en los espacios entre los extremos de la tibia o del fémur rotos del perro. A medida que las células migraban hacia la matriz de colágeno, incorporaban el plásmido y producían hormona paratiroidea. En casi un mes se observó un aumento dependiente de la dosis en la formación de hueso (fig. 21-26). Este tipo de tratamiento tiene el potencial de ayudar a las personas con grandes fracturas óseas así como a aquellas con osteoporosis.

Otra aproximación es encontrar la mezcla correcta de factores paracrinos para reclutar a las células madre y producir hueso normal. Peng y col. (2002) modificaron genéticamente a las células madre de músculo para secretar BMP4 y VEGF. Estas células fueron colocadas en discos de matrices de geles que fueron implantados en las heridas hechas en los cráneos de ratón. Los investigadores hallaron que ciertas proporciones de BMP4 y de VEGF fueron capaces de cicatrizar las heridas al producir nuevo hueso. Del mismo modo, BMP2 ha sido utilizado para cicatrizar grandes fracturas de las mandíbulas de los primates y de los fémures de los conejos (Li y col. 2002; Marukawa y col. 2002).

REGENERACIÓN NEURONAL. Aunque el sistema nervioso central se caracteriza por su capacidad para cambiar y producir nuevas conexiones, tiene muy poca capacidad regenerativa. Sin embargo, las neuronas motoras del sistema nervioso periférico tienen un poder regenerativo significativo, incluso en mamíferos adultos. La regeneración de las neuronas motoras involucra la regeneración de los axones dañados, no el reemplazo de cuerpos celulares que se han perdido o han enfermado. Si se destruye el cuerpo celular de una neurona motora, éste no puede ser reemplazado.

La vaina de mielina que cubre al axón de la motoneurona es necesaria para su regeneración. Esta vaina es producida por las células de Schwann, un tipo del célula glial del sistema nervioso periférico (véase cap. 12). Cuando un axón es dañado, las células de Schwann se dividen para formar un camino a lo largo del cual el axón puede regenerar desde el muñón proximal. Esta proliferación de las células de Schwann es crítica para dirigir la regeneración del axón hacia la membrana basal de la célula de Schwann original. Si el axón en regeneración puede encontrar la membrana basal, puede ser guiado a su blanco y restaurar la conexión original. A su vez, las neuronas que regeneran secretan mitógenos que les permiten a las células de Schwann dividirse. Algunos de estos mitógenos son específicos para el desarrollo o la regeneración del sistema nervioso (Livesey y col. 1997).

Bajo condiciones normales las neuronas del sistema nervioso central no pueden regenerar sus axones. Por lo tanto, las lesiones de la médula espinal pueden causar pa-

una estrategia para resolver este bloqueo es encontrar los caminos que aumentan la población de las células madre neurales adultas y dirigir su desarrollo de modo que se sorteen las lesiones causadas por la enfermedad o el trauma. Las células madre neurales encontradas en los mamíferos adultos pueden ser muy similares a las células madre embrionarias y pueden responder a los mismos factores de crecimiento (Johe y col. 1996; Johansson y col. 1999).

Otra estrategia para la regeneración neural del SNC es crear ambientes que estimulen el crecimiento axonal. A diferencia de las células de Schwann del sistema nervioso periférico, las células gliales mielinizantes del sistema nervioso central, los oligodendrocitos, producen sustancias que inhiben la regeneración axonal (Schwab y Caroni 1988). Las células de Schwann trasplantadas desde el sistema nervioso periférico hacia la lesión del SNC son capaces de estimular el crecimiento de los axones del SNC hacia sus blancos de interés (Keirstead y col. 1999; Weidner y col. 1999). Se han aislado tres sustancias desde la mielina del oligodendrocito que inhiben el crecimiento axonal: glucoproteína asociada a mielina, Nogo-1 y glucoproteína de mielina de oligodendrocito (Mukhopadyay y col. 1994; Chen y col. 2000; GrandPré y col. 2000; K. Wang y col. 2002). Los anticuerpos contra Nogo-1 y el bloqueo del receptor Nogo permiten la regeneración parcial del axón después de la lesión de la médula espinal (Schnell y Schwab 1990; GrandPré y col. 2002). Además, en los sitios de la lesión del SNC se forma una cicatriz glial, que contiene proteoglucanos condroitín sulfato en su matriz extracelular. Estos compuestos también inhiben el crecimiento axonal. Cuando Bradbury y col. (2002) liberaron condroitinasas a las médulas espinales lesionadas de ratas adultas, los axones fueron capaces de crecer más allá de las lesiones. La investigación hacia la regeneración axonal del SNC puede convertirse en una de las contribuciones más importantes de la biología del desarrollo a la medicina.

Resumen: implicaciones médicas de la biología del desarrollo

1. La fecundación in vitro involucra la recuperación de ovocitos desde el ovario y su posterior mezcla con los espermatozoides. Luego se insertan en el útero los cigotos en división.
2. La inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) involucra la inyección de un espermatozoide directamente en el citoplasma del ovocito.
3. En la transferencia intratubaria de gameto (GIFT), los espermatozoides son inyectados en la trompa de Falopio cuando el ovocito es ovulado.
4. La mayor parte de los ovocitos humanos fecundados no llega exitosamente a término. Las anomalías cromosómicas son la principal causa de muerte fetal temprana. Las anomalías congénitas pueden ser debidas a mutaciones génicas, aneuploidías cromosómicas o teratógenos, o a la combinación de una predisposición genética y de los efectos ambientales.
5. El clonado génico posicional comienza con un análisis de genealogía y hace un mapa de DNA de la región que difiere entre las personas que tienen un fenotipo particular y las que carecen de él.
6. El mapeo del gen candidato comienza con una correlación entre una región génica y un gen cuya mutación causa un fenotipo similar en otras especies.
7. La pleiotropía se produce cuando varios efectos diferentes son producidos por un solo gen. En la pleiotropía en mosaico, cada efecto es causado independientemente por la expresión del mismo gen en diferentes tejidos. En la pleiotropía relacional, la expresión génica anormal en un tejido influye sobre otros tejidos, aun en los otros tejidos que no expresan este gen.
8. La heterogeneidad genética se produce cuando las mutaciones en más de un gen pueden producir el mismo fenotipo.
9. La variabilidad fenotípica se origina cuando el mismo gen puede producir diferentes defectos (o diferir en la gravedad del mismo defecto) en diferentes individuos.
10. La herencia dominante puede ser causada por haploinsuficiencia, en la que la expresión de una sola copia de un gen no es suficiente para producir el fenotipo tipo salvaje; por medio de mutaciones de ganancia de función, en las que una vía es activada independientemente de su iniciador normal; o por alelos dominantes negativos, alelos mutantes que codifican una subunidad de una proteína cuya disfunción produce la totalidad de la proteína no funcional.
11. Los errores congénitos de expresión de genes pueden causar anomalías a niveles de la transcripción, del procesamiento del RNA, de la traducción y de la modificación postranscripcional.
12. El síndrome del X frágil, la principal causa de retardo mental en humanos, es causado por una sobreabundancia de CGG repetidas en el gen *FMR1*. Estas repeticiones impiden la transcripción del gen *FMR1*. La proteína codificada por *FMR1* parece dirigir a ciertos genes neuronales al ribosoma para su traducción.
13. La genética de la preimplantación involucra el estudio in vitro para las anomalías genéticas en los embriones tempranos y la implantación solamente de aquellos embriones que pueden desarrollarse normalmente. Con el uso de la genética de la preimplantación también es posible la selección del sexo.
14. Los agentes teratogénicos incluyen a ciertos químicos como etanol, ácido retinoico y ácido valproico, así como metales pesados, ciertos patógenos y radiación ionizante.
15. Los disruptores endocrinos pueden unirse o bloquear a los receptores de hormonas o bloquear la síntesis, el transporte o la excreción de hormonas.
16. DES es un poderoso disruptor endocrino. Actualmente, el bisfenol A y otros PCB están siendo consi-

te analogues: Potent tools to fight against cancer. Curr. Med. Chem. 9: 1417-1433.

Boehm, T., J. Folkman, T. Browder and M. S. O Reilly. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature 390: 404-407.

Boiani, M., S. Eckardt, H. R. Scholer and K. J. McLaughlin. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency. Genes Dev. 16: 1209-1219.

Bonadio, J., E. Smiley, P. Patil and S. Goldstein. 1999. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. Nature Med. 5: 753-759.

Boué, A., J. Boué and A. Gropp. 1985. Cytogenetics of pregnancy wastage. Adv. Hum. Genet. 14: 1-57.

Boutin, E. L. and G. R. Cunha. 1997. Estrogeninduced proliferation and cornification are un- coupled in sinus vaginal epithelium associated with uterine stroma. Differentiation 62: 171-178.

Bradbury, E. J. and 7 others. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature 416: 636-640.

Brown,V. and 10 others. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile-X syndrome. Cell 107:477-487.

Brustle, O. and 7 others. 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. Science 285: 754-756.

Cagen, S. Z. and 10 others. 1999. Normal reproductive organ development in CF-I mice following prenatal exposure to bisphenol A. Toxicol. Sci. 50: 36-44.

Cao, Y. and R. Cao. 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature 398: 381.

Carlsen, E., A. Gwercman, N. Keiding and N. Skakkebaek. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit. Med J. 305: 609-613.

Carlson, B. M. 1999. Human Embryology and Developmental Biology, 2nd Ed. Mosby, New York.

Carson, R.1962. Silent Spring. Houghton Mifflin, New York.

Carvey, P. M., Z. D. Ling, C. E. Sortwell, M. R. Pitzer, S. O. McGuire, A. Storch and T. J. Collier. 2001. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: A source of cells for transplantation in Parkinson's disease. Exp. Neurol. 171: 98-108.

CDC (Centers for Disease Control). 2002a. ART 1997: National Summary. http://www2.cdc.gov/ nccdphp/drh/art-97/nation97.asp.

CDC (Centers for Disease Control). 2002b. Rubella near elimination in the United States. Press release at http://www.cdc.gov/od/ocl media/pressreVrO20429.htm

Chan, A. W. S., K. Y. Chong, C. Martinovich, C. Simerly and G. Schatten. 2001. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science 291: 309-312.

Check, E. 2002. A tragic setback. Nature 420: 116-118.

Chen, M. S. and 7 others. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-I. Nature 403: 434-439.

Clarren, S. K. 1986. Neuropathology in the fetal alcohol syndrome. In J. R. West (ed.), Alcohol and Brain Development. Oxford University Press, New York.

Cohlan, S. Q. 1953. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. Science 117: 535-537.

Colburn, T., D. Dumanoski and J. P. Myers. 1996. Our Stolen Future. Dutton, New York.

Coleman, H., J. Nabekura and J. W. Lichtman. 1997. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. Science 275: 356-361

Coleman, W. B., A. E. Wennerberg, G. J. Smith and J. W. Grisham. 1993. Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stemlike) cells by the hepatic microenvironment. Am. J. Pathol. 142: 1373-1382.

Collins, F. S. 1992. Positional cloning: Lets not call it reverse anymore. Nature Genet. 1: 3-6.

Cooper, T. A. and W. Mattox. 1997. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. Am. J. Hum. Genet. 61: 259-266.

Creech Kraft, J. 1992. Pharmacokinetics, placental transfer, and teratogencity of 13-cis retinoic acid, its isomer and metabolites. In G. M. Morriss-Kay (ed.), Retinoids in Normal Development and Teratogenesis. Oxford University Press, Oxford, pp. 267-280.

Croft, L., S. Schandorff, F. Clark, K. Burrage, P. Arctander and J. S. Mattick. 2000. ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. Nature Genet. 24: 340-341.

D Amato, R. J., M. S. Loughnan, E. Flynn and J. Folkman.1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4082-4085.

Darnell, J. C., K. B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S. T. Warren and R. B. Darnell. 2001. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. Cell 107: 489-499.

Davis, W. L., L. A. Crawford, O. Cooper, G. R. Farmer, D. Thomas and B. L. Freeman. 1990. Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in culture. J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. 10: 277-293.

De Boulle, K. and 9 others. 1993. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. Nat. Genet. 3: 31-35.

Di Berardino, M. A. 2001. Animal cloning: The route to new genomics in agriculture and medicine. Differentiation 68: 67-83.

Dorris, M. 1989. The Broken Cord. Harper and Row, New York.

Dredge, K. and 7 others. 2002. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. Brit. J. Cancer 87: 1166-1172.

Drukker, M. and 8 others. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9864-9869.

Dudek, R. W. and J. T. Fix. 1998. Embryology. Lippincott/Williams and Wilkins, Baltimore.

Eck, S. L. 1999. The prospects for gene therapy. Hosp. Pract. 34: 67-75.

Edmonds, D. K., IC. S. Lindsay, J. F. Miller, E. Williamson and P. J. Wood.1982. Early embryonic mortality in women. Fertil. Steril. 38: 447-453.

Edwards, M.1994. Pollution in the former Soviet Union: Lethal legacy. Natl. Geog. 186(2):70-115.

Eldadah, Z. A., T. Brenn, H. Furthmayr and H. C. Dietz. 1995. Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. J. Clin. Invest. 95: 874-880.

Epstein, C. J., R. P. Erickson and A. Wynshaw-Boris (eds.). 2003. General principles of differentiation and morphogenesis. In The Molecular Basis of Inborn Errors of Development. Oxford University Press, New York. In press.

Eriksson, C. J. and 21 others. 2001. Functional relevance of human adh polymorphism. Alcohol Clin. Exp. Res. 25 (Suppl.): 157S-163S.

Ermak, G., T. E. Morgan and K. J. Davies. 2001. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCRI (Adapt78) is associated with Alheimers disease. J. Biol. Chem. 276: 38787-38794.

Ermak, G., C. D. Harris and K. J. Davies. 2002. The DSCRI (Adapt78) isoform I protein calcipressin I inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage; including transient oxidative stress. FASEB J. 16:814-824.

Eto, K. 2000. Minamata disease. Neuropathology 20 (Suppl.): S14-S19.

Eto, K. and 7 others. 2001. Methylmercury poisoning in common marmosets: A study of selective vulnerability within the cerebral cortex. Toxicol. Pathol. 29: 565-573.

Fairchild, W. L., E. O. Swansburg, J. T. Arsenault and S. B. Brown. 1999. Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (Salmo salar) represent a case of endocrine disruption? Environ. Health Perspect. 107: 349-358.

Feng, Y., D. Absher, D. E. Eberhart, V. Brown, H. E. Malter and S. T. Warren. 1997a. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the 1304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. Mol. Cell 1: 109-118.

Feng, Y., C. A. Gutekunst, D. E. Eberhart, H; Yi, S. T. Warren and S. M. Hersch. 1997b. Fragile X mental retardation protein: Nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. J. Neurosci. 17: 1539-1547.

Folkman, J. 1974. Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. 19: 331-358.

Folicman, J. P., P. Hahnfeldt and L. Hlatky. 2000. Cancer: Looking outside the genome. Nature Rev. Cell Biol. 1: 76-79.

Fontana, J. A. and A. K. Rishi. 2002. Classical and novel retinoids: Their targets in cancer therapy. Leukemia 16: 463-472.

Franco, B. and 12 others. 1995. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: Mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. Cell 81: 15-21.

Freire-Maia, N. 1975. A heterozygote expression of a "recessive" gene. Hum. Hered. 25: 302-304.

Fuentes, J. J., L. Genesca, T. J. Kingsbury, K. W. Cunningham, M. Perez-Riba, X. Estivill and S. de la Luna. 2000. DSCRI, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. Hum. Mol. Genet. 9: 1681-1690.

Fukuyama, F. 2002. Our Post-Human Future: Consequences of the Biotechnology Revolution. Farrar, Straus and Giroux, NY.

Gage, F. H.1998. Cell therapy. Nature 392: 18-24.

Gearhart, J. 1998. New potential for human embryonic stem cells. Science 282: 1061-1062.

Giroud, A. and M. Martinet. 1959. Teratogenese pur hypervitaminose A chez le rat, la souris, le cobaye, et le lapin. Arch. Fr. Pediatr. 16: 971-980.

Glausiusz, J. 2002. The woes of the clones. Discover 23(8): 11.

Gleicher, N., D. M. Oleske, I. Tur-Kaspa, A. Vidali and V. Karande. 2000. Reducing the risk of high-order multiple pregnancy after ovarian stimulation with gonadotropins. N. Engl. J. Med 343: 2-7

Goulding, E. H. and R. M. Pratt. 1986. Isotretinoin teratogenicity in mouse whole embryo culture. J. Craniofa Genet. Dev. Biol. 6: 99-112.

GrandPré, T., F. Nakamura, T. Vartanian and S. M. Strittmatter.2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. Nature 403: 439-442.

GrandPré, T., S. Li and S. M. Strittmatter. 2002. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. Nature 417: 547-551.

Gregg, N. M. 1941. Congenital cataract following German measles in the mother. Trans. Opthalmol. Soc. Aust. 3: 35.

Grignani, F. and 14 others. 1998. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. Nature 391: 815-818.

Gruneberg, H. 1938. An analysis of the "pleiotropic" effects of a new lethal mutation in the rat (Mus norwegicus). Proc. R. Soc Lond B 125: 123-144.

Guillette, E. A., M. M. Meza, M. G. Aquilar, A. D. Soto and I. E. Garcia. 1998. An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. Environ. Health Perspect. 106: 347-353.

Gupta, C. 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 224: 61-68.

Hadorn, E. 1955. Letalfaktoren in ihrer Bedeutung fur Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Thieme Verlag, Stuttgart.

Hanahan, D. and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353-364.

Hansen, L. A., C. C. Sigman, F. Andreola, S. A. Ross, G. J. Kelloff and L. M. De Luca. 2000. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. Carcinogenesis 21: 1271-1279.

Haraway, D. 1997. Modest-Witness@Second-Millenium. Routledge, New York.

Hemesath, T. J. and 9 others. 1994. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev. 8: 2770-2780.

Herman-Giddens, M. E., E. J. Slora, R. C. Wasserman, C. J. Bourdony, M. V. Bhapkar, G. G. Koch and C. M. Hasemeir. 1997. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: A study from the pediatric research in office settings network. Pediatrics 99: 505-512.

Hill, M., C. Stabile, L. K. Steffen and A. Hill. 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. Environ. Pollut. 117: 295-300.

Hodgkinson, C. A., K. J. Moore, A. Nakayama, E. Steingrimsson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and H. Arnheiter. 1994. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic helix-loop-helix-zipper protein. Cell 74: 395-404.

Soto, A., H. Iusticia, J. Wray and C. Sonnenschein. 1991. p-nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. Environ. Health Perspect. 92: 167-173.

Stern, H., S. Wiley, R. Matken, D. Karabinus and K. Blauer. 2002. MicrosortrM babies: 1994-2002 preliminary postnatal follow-up results. Fertil. Steril. 78(S1): S133.

Sternlicht, M. D. and 8 others. 1999. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell 98: 1376.

Stewart, T. A. and B. Mintz. 1981. Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6314-6318.

Stock, G. and J. Campbell (ed). Engineering the Human Genome: Summary Report. Science, Technology, and Society Program, UCLA. http://www.ess.ucla.edu:80/huge/report.html July 11 1998.

Streissguth, A. P. and R. A. LaDue. 1987. Fetal alcohol: Teratogenic causes of developmental disabilities. In S. R. Schroeder (ed.), Toxic Substances and Mental Retardation. American Association of Mental Deficiency, Washington, DC, pp. 1-32.

Studer, M., H. Popperl, H. Marshall, A. Kuroiwa and R. Krumlauf. 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-l. Science 265: 1728-1732.

Sulik, K. K., C. S. Cook and W. S. Webster. 1988. Teratogens and craniofacial malformations: Relationships to cell death. Development 103 (Suppl.): 213-231.

Swan, S. H., E. P. Elkin and L. Fenster. 2000. The question of dedining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. Environ. Health Perspect. 108: 961-966.

Tachibana, M and 9 others. 1994. Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene, and the assignment to human chromosome 3, region p14.1-p12.4. Hum. Mol. Genet. 3: 553-557.

Tassabehji, M., V. E. Newton and A. P. Read. 1994. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. Nature Genel. 8: 251-255.

Terada N. and 9 others. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 416: 542-545.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiegiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145-1147.

Tiberio, G. 1994. MZ female twins discordant for X-linked diseases: A review. Acta Genet. Med. Gemellol. 43: 207-214.

Ton, C. T. and 14 others. 1991. Positional cloning and characterization of a paired-box and homeobox-containing gene from the aniridia region. Cen 67: 1059-1074.

Trounson, A. O. and D. K. Gardner (eds.). 2000. Handbook of In Vitro Fertilization, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Valleix, S., C. Vinciguerra, J. M. Lavergne, M. Leuer, M. Delpech and C. Negrier. 2002. Skewed X-chromosome inactivation in monochorionic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. Blood 100: 3034-3036.

Volpe, E. P. 1987. Developmental biology and human concerns. Am. Zool. 27: 697-714.

vom Saal, F. S.2000. Very low doses of bisphenol A and other estrogenic chemicals alters development in mice. Endocrine Disruptors and Pharmaceutical Active Compounds in Drinking Water Workshop. http://wvw.cheec.uiowa.edu /conferences/edc_2000/vom_saal.html.

vom Saal, F. S., P. S. Cooke, D. L. Buchanan, P. Palanza, K. A. Thayer, S. C. Nagel, S. Parmigiani and W. F. Welshons. 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. Toxicol. Ind. Health 14: 239-260.

Vortkamp, A., S. Pathi, G. M. Peretti, E. M. Caruso, D. J. Zaleske and C. J. Tabin. 1998. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. Mech. Dev. 71: 65-76.

Wagers, A. J., R. I. Sherwood, J. L. Christensen and I. L. Weissman. 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 297: 2256-2259.

Wang, K., C. V. Koprivica, J. A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R. L. Neve and Z. He.2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. Nature 417: 941-944.

Wang, X., M. Kiledjian, I. M. Weiss and S. A. Liebhaber. 1995. Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human á-globin mRNA stability. Mol. Cel. Biol. 15: 1769-1777.

Wang, X. and 9 others. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism and infant birth weight. J. Am. Med. Assoc 287: 195-202.

Weaver, V. M., O. W. Petersen, F. Wang, C. A. Larabell, P. Briand, C. Damsky and M. J. Bissell.1997. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin-blocking antibodies. J. Cell Biol. 137: 231- 245.

Weidner, N., A. Blesch, R. J. Grill and M. H. Tuszynski. 1999. Nerve growth factor-hyper-secreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a pheno-typically appropriate manner that correlates with expression of L1. J. Comp. Neurol. 413: 495-506.

Wetherill, Y. B., C. E. Petse, K. R. Monk, A. Puga and K. E. Knudson. 2002. Xenoestrogen bisphenol-A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. Mol. Cancer Ther. 1: 515-524.

Wennerholm, U. B., C. Bergh, L. Hamberger, K. Lundin, L. Nilsson, M. Wikland and B. Kallen. 2000. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. Hum. Reprod 15: 944-948.

Wickelgren, I. 1999. Stem cells. Rat spinal cord function partially restored. Science 286: 1826-1827.

Wilmut, I. and 7 others. 2002. Somatic cell nuclear transfer. Nature 419: 583-586.

Wolf, U. 1995. The genetic contribution to the phenotype. Hum. Genet. 95: 127-148.

Wolf, U. 1997. Identical mutations and phenotypic variation. Hum. Genet. 100: 305-321.

Wu, P., Y.I. Tarasenko, Y. Gu, L. Y. Huang, R. E. Coggeshall and Y. Yu.2002. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. Nature Neurosci. 5: 1271-1278.

Xia, H., Q. Mao, H. L. Paulson and B. L. Davidson. 2002. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. Nature Biotech. 20: 1006-1010.

Capítulo 22 Regulación ambiental del desarrollo animal

Ahora podemos cambiar de dirección para considerar las adaptaciones hacia el ambiente externo, y en primer lugar las adaptaciones dirigidas... en las que el animal, durante su desarrollo, se modifica por factores externos de modo tal que aumenta su eficiencia al tratar con ellos.

C. H. WADDINGTON (1957)

¿Por qué nuestro cuerpo debería terminar en nuestra piel, o incluir, como mucho, a otros que están siendo encapsulados por la piel?

DONNA HARAWAY (1991)

SE HA PENSADO DURANTE MUCHO TIEMPO que el ambiente solo desempeña papeles menores en el desarrollo. Se creía que casi todos los fenómenos de desarrollo eran regulados por los genes, y que aquellos organismos cuyo desarrollo era controlado de modo significativo por el ambiente eran considerados rarezas interesantes. Sin embargo, los estudios recientes demuestran que el contexto ambiental desempeña un papel significativo en el desarrollo de casi todas las especies, y que el genoma de los animales y de las plantas ha evolucionado para responder a las condiciones ambientales (cuadro 22-1). Además, las asociaciones simbióticas, por medio de las cuales los genes de un organismo son regulados por los productos de otro organismo, parecen ser la regla más que la excepción.

Una de las razones por la que los biólogos del desarrollo han ignorado durante mucho tiempo al ambiente es que uno de los criterios para seleccionar qué animales estudiar ha sido la capacidad para desarrollarse regularmente en el laboratorio. Administrándoles una nutrición y temperatura apropiadas, estos "sistemas modelo" –*C. elegans*, moscas de la fruta, erizos de mar, *Xenopus*, pollos y ratones de laboratorio– se desarrollan independientemente de su ambiente (Bolker 1995). Estos animales pueden dar una impresión errónea que todo lo necesario para que se forme el embrión está dentro del gameto femenino fecundado. En la actualidad, con las nuevas preocupaciones sobre la pérdida de la diversidad de organismos y los efectos de los contaminantes ambientales, hay un interés renovado en la regulación del desarrollo por el ambiente (véase van der Weele 1999; Gilbert 2001).

Hay numerosos ejemplos (y el *Homo sapiens* proporciona alguno de los mejores) en los cuales el ambiente desempeña un papel crítico en la determinación del fenotipo del organismo. En los capítulos 3 y 17 se encontraron determinaciones sexuales y morfologías reguladas por el ambiente. En estos y en muchos otros casos, el ambiente puede causar diferentes fenotipos desde el mismo genotipo nuclear. Por supuesto que la capacidad genética para responder a tales factores ambientales tiene que ser heredada, pero en éstos casos es el ambiente el que dirige la formación de un fenotipo particular.

En este capítulo se discutirá cómo los organismos utilizan las señales ambientales en el curso de su desarrollo normal y además cómo los compuestos exógenos hallados en el ambiente pueden desviar el desarrollo de su camino habitual y causar anomalías congénitas.

El ambiente como parte del desarrollo normal

Si el ambiente contiene componentes previsibles (como la gravedad) o cambios previsibles (como las estaciones), estos elementos pueden llegar a ser parte del desarrollo de un organismo. Cualquier animal en desarrollo puede esperar encontrar como parte de su ambiente un campo gravitacional de 1G, bacterias y hongos. Muchas especies los han utilizado como agentes para el desarrollo normal.

Cuadro 22-1 *Algunos aspectos cubiertos por la biología del desarrollo ecológica*

DESARROLLO NORMAL DEPENDIENTE DEL CONTEXTO
- A. Polifenismos morfológicos
  1. Dependiente de la nutrición (*Nemoria*, castas de himenópteros, larvas de erizo de mar)
  2. Dependiente de la temperatura (*Arachnia, Bicyclus*)
  3. Dependiente de la densidada (langosta)
  4. Dependiente de la tensión (*Scaphiopus*)
- B. Polifenismos de determinación sexual
  1. Dependiente de la localización (*Bonellia, Crepidula*)
  2. Dependiente de la temperatura (*Menidia*, tortugas)
  3. Dependiente del contexto social (lábridos –wrasses, góbidos)
- C. Polifenismos inducidos por el depredador
  1. Morfologías adaptativas que evitan al depredador (*Daphnia, Hyla*)
  2. Respuestas inmunológicas adaptativas (*Gallus, Homo*)
  3. Asignaciones reproductivas adaptativas (colonias de hormigas)
- D. Formación de hueso inducido por tensión
  1. Prenatal (cresta peronea en aves)
  2. Posnatal (rótula en mamíferos; ¿maxilar inferior en seres humanos?)
- E. Sistemas neurales sensibles al ambiente
  1. Sinapsis visuales mediadas por la experiencia (*Felix*, monos)
  2. Remodelación cortical (extremidades fantasmas; aprendizaje)

PROGRESIÓN DEL CICLO DE VIDA DEPENDIENTE DEL CONTEXTO
- A. Colonización larval
  1. Metamorfosis inducida por sustrato (bivalvos, gasterópodos)
  2. Metamorfosis inducida por la presa (gasterópodos, chitones o apretadores)
  3. Metamorfosis dependiente de temperatura/fotoperíodo
- B. Diapausa
  1. Supervivencia al invierno en insectos
  2. Implantación retrasada en mamíferos
- C. Progresión sexual/asexual
  1. Inducida por temperatura/fotoperíodo (*áfidos, Megoura*)
  2. Inducida por temperatura/colonia (*Volvox*)
- D. Simbiosis/parasitismo
  1. Alimentación de sangre (*Rhodnius, Aedes*)
  2. Comensalismo (*Euprymna/Vibrio*; huevos/algas; *Paleon/Alteromonas*; microbios del intestino de mamíferos)
  3. Parásitos (*Wollbachia* en la cochinilla –chanchito)
- E. Interacciones de desarrollo planta-insecto

ADAPTACIONES DE LOS EMBRIONES Y DE LAS LARVAS A LOS AMBIENTES
- A. Protección del huevo
  1. Pantallas solares contra la radiación (*Rana*, erizos de mar)
  2. Protección derivada de la planta (*Utetheisa*)
- B. Protección larval
  1. Protección derivada de la planta (*Danaus*, escarabajos tortuga)

TERATOGÉNESIS
- A. Teratógenos químicos
  1. Compuestos naturales (retinoides, alcohol, plomo)
  2. Compuestos sintéticos (talidomida, warfarina)
  3. Hormonas imitadoras (dietilestilbestrol, PCB)
- B. Agentes infecciosos
  1. Virus (*Coxsackie, Herpes, Rubéola*)
  2. Bacterias (*Toxoplasma, Treponema*)
- C. Condiciones maternas
  1. Desnutrición
  2. Diabetes
  3. Autoinmunidad

Fuente: Según Gilber 2001.
Comentario: No se debería pensar que en la lista está todo incluido. Por ejemplo, la lista está limitada a animales; aquí no se incluyen la plasticidad del desarrollo de las plantas y muchas interacciones entre plantas y animales.

Gravedad y presión

En los capítulos 10 y 11 se dijo que la gravedad es crítica para la formación del eje en las ranas y en los pollos. Además, hay varios huesos en los que su formación depende de la tensión ocasionada por los movimientos del embrión. Tal tensión se sabe que es responsable de la formación de la patella (rótula) humana después del nacimiento. En los vertebrados, la diferenciación celular del cartílago y la producción de matriz de cartílago depende de una interacción mecano-sensitiva entre un número de genes y de productos génicos. Uno de los más importantes de estos genes es Sox9, que es regulado en más por la fuerza de compresión (Takahashi y col., 1998). La proteína *Sox9* activa a numerosos genes que forman hueso (véase cap. 14). Las fuerzas de tensión también activan a las proteínas morfogéneticas del hueso y alinean a los condrocitos (Bard 1990; Sato y col. 1999; Ikegame y col. 2001). Estudios recientes (Q. Wu y col. 2001) involucran a *indian hedgehog* como una molécula de señalización clave que es estimulada por la tensión y que activa a las proteínas morfogenéticas del hueso.

En el pollo, varios huesos no se forman si se elimina el movimiento dentro del huevo. Uno de estos huesos es la **cresta peronea** (fibular), que conecta la tibia con el peroné y permite que la fuerza del músculo ilioperoneo ti-

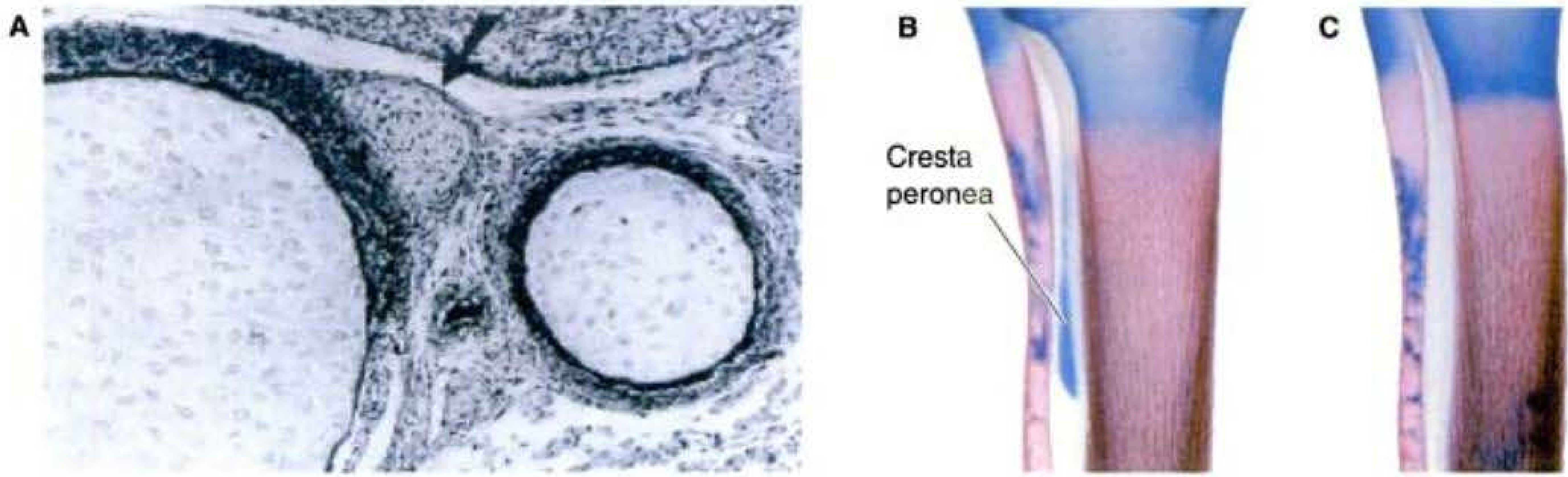


Fig. 22-1. Formación de la cresta peronea inducida por la actividad. La cresta peronea (sindesmosis tibioperonea) se forma cuando el movimiento del embrión en el huevo ejerce presión sobre la tibia. **A.** Sección transversal a través de la extremidad del pollo del día 10 embrionario, que muestra la condensación (flecha) que se convertirá en la cresta peronea. **B.** Embrión de pollo de 13 días que muestra la cresta peronea formándose entre los huesos de la tibia y del peroné. **C.** Ausencia de cresta peronea en el tejido conectivo de un embrión de 13 días cuyos movimientos fueron inhibidos. El colorante azul tiñe el cartílago, mientras que el colorante rojo tiñe los elementos óseos. (Según Müller 2003; fotografías cortesía de G. Müller.)

re directamente desde el fémur hacia la tibia. Se piensa que esta conexión directa fue importante en la evolución de las aves y que la cresta peroneal es una característica universal de las extremidades posteriores de las aves (Müller y Steicher, 1989). Cuando se impide que las aves se muevan dentro de su huevo, no se desarrolla este hueso (fig. 22-1; K. C. Wu y col., 2001; Müller 2003). Por esta razón, incluso en la formación de características tan importantes como los huesos, el ambiente puede desempeñar un papel crítico.

Simbiosis en el desarrollo

En algunos casos, el desarrollo de un individuo es ocasionado por la presencia de organismos de diferentes especies. En algunos organismos, esta relación se ha convertido en **simbiótica** (Sapp 1994): los simbiontes llegan a estar estrechamente integrados en el organismo huésped de modo tal que el huésped no puede desarrollarse sin ellos. Evidencia reciente (McFall-Ngai 2002) indica que la simbiosis del desarrollo es extremadamente común y que puede constituir una "regla" en lugar de un caso excepcional.

Uno de los ejemplos de la simbiosis del desarrollo mejor estudiados es la que hay entre el calamar *Euprymna scolopes* y la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. El *Euprymna* adulto está equipado con un órgano de luz compuesto de sacos que contienen a esta bacteria luminosa. Sin embargo, el calamar juvenil no contiene estos simbiontes que emiten luz, ni tiene una estructura que los albergue. En su lugar, el calamar adquiere la bacteria del agua de mar bombeada a través de su cavidad del manto. La bacteria se une a un epitelio ciliado que se extiende hacia la cavidad. El epitelio solo une a *V. fisheri*, permitiendo que otras bacterias pasen a través de éste. La bacteria induce la muerte apoptótica de estas células epiteliales, su reemplazo por un epitelio no ciliado y la diferenciación de las células epiteliales que lo rodean hacia un saco de almacenamiento para la bacteria (fig. 22-2; McFall-Ngai y Ruby 1991; Montgomery y McFall-Ngai 1995).

La simbiosis entre los huevos agrupados en grandes cantidades y la fotosíntesis de las algas es crítica para el desarrollo de varias especies. Las nidadas de huevos de anfibios y de caracol, por ejemplo, son agrupadas en grandes cantidades o "masas" muy apretadas entre sí. El suministro de oxígeno limita el grado de desarrollo, de modo tal que los embriones del interior del grupo se desarrollan más lentamente que aquellos cerca de la superficie (Strathmann y Strathmann 1995). Mientras que hay un pronunciado gradiente de oxígeno desde el exterior del grupo hacia la profundidad dentro de éste, los embriones parecen resolver este problema al rodearse ellos mismos con una delgada envoltura de algas fotosintéticas. En las nidadas de huevos de anfibios y de caracol, la fotosíntesis de esta "contaminación" algal permite la producción de oxígeno en la luz, mientras que la respiración sobrepasa a la fotosíntesis en la oscuridad (Bachmann y col. 1986; Pinder y Friet 1994; Cohen y Strathmann 1996). Por lo tanto, las algas "rescatan" a los huevos mediante fotosíntesis.

La simbiosis entre los huevos y las bacterias puede proteger a los huevos de los hongos patógenos. Los huevos de langosta y de camarones, por ejemplo, son propensos a infecciones fúngicas. (Como cada uno que posee un acuario sabe, el alimento para peces sin ser comido rápidamente se rodea por un halo de hongos filamentosos.) Los córiones de estos huevos de crustáceos en realidad atraen a las bacterias que producen compuestos fungicidas (Gil-Turnes y col. 1989).

Una relación aún más estrecha entre la morfogénesis y la simbiosis es ejemplificada por la avispa parasitaria *Asobara tabida* y el cicadélido *(leafhopper) Euscelis incisus*. En estos insectos, las bacterias simbióticas son halladas dentro del citoplasma del huevo y son transferidas a lo largo de las generaciones, como las mitocondrias. En el cicadélido, estas bacterias llegan a ser tan especializadas que llegan a multiplicarse solo dentro del citoplasma del cicadélido y el huésped llega a ser tan dependiente de las bacterias que no puede completar su embriogénesis sin ellas. En realidad, las bacterias simbiontes parecen ser esenciales para la formación del intestino embrionario. Si las bacterias son eliminadas quirúrgicamente o metabólicamente de los huevos por medio de la alimentación con antibióticos a las larvas o adultos, los ovocitos

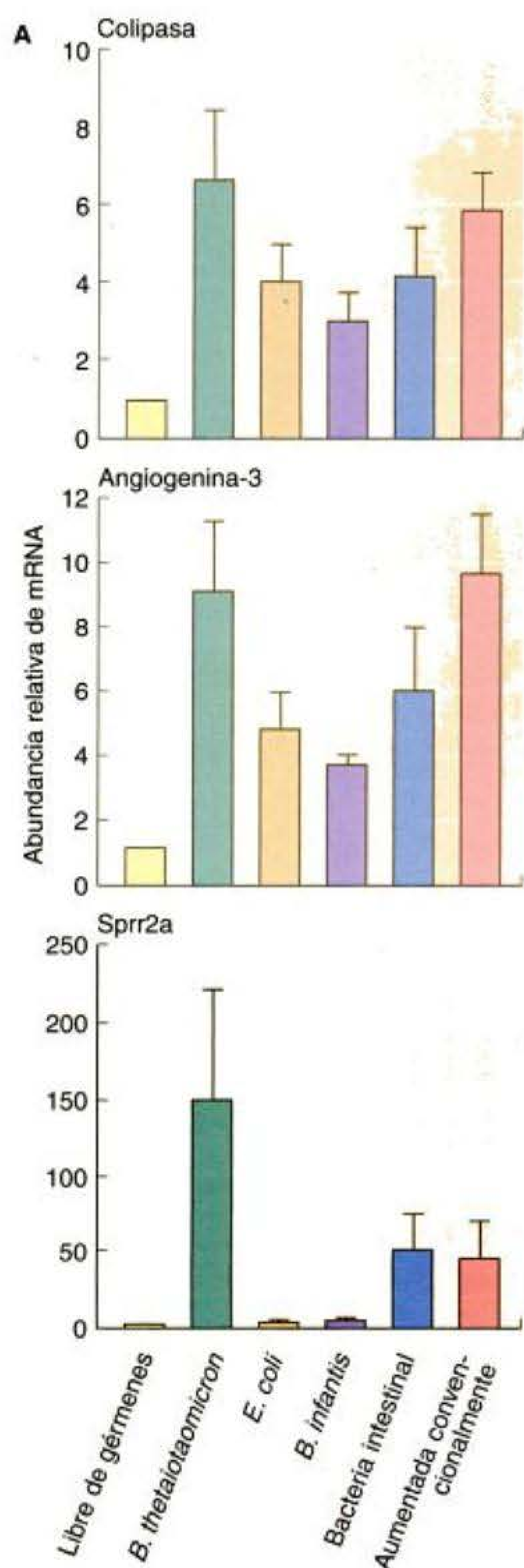


Fig. 22-4. Especificidad de la respuesta del genoma huésped a diferentes bacterias. **A.** Los ratones criados en ambientes "libres de gérmenes" fueron dejados solos o inoculados con uno o más tipos de bacterias. Después de 10 días, se aislaron sus mRNA intestinales y se estudiaron mediante micromatrices. Los ratones que crecieron en condiciones "libres de gérmenes" tenían muy poca expresión de los genes que codificaban colipasa, angiogenina-3 o sprr2a. Varias bacterias diferentes, *Bacteroides thetaiotaomicron, E. coli, Bifidobacterium infantis,* y una variedad de bacterias intestinales recolectadas desde ratones criados convencionalmente, indujeron los genes para colipasa y angiogenina-3. *B. thetaiotaomicron* parece ser totalmente responsable del incremento en unas 205 veces en la expresión de *sprr2a* en los animales libres de gérmenes. **B.** Sección al microscopio confocal de un lecho capilar de una vellosidad intestinal en un ratón criado por 6 semanas en condiciones libres de gérmenes. Los capilares están teñidos de verde. **C.** Red capilar de una vellosidad intestinal de un ratón criado por 6 semanas en condiciones libres de gérmenes y luego inoculado con microbios intestinales convencionales 10 días antes de ser examinado. La red de capilares está completamente desarrollada. (**A**, según Hooper y col. 2001; **B,C**, según Stappenbeck y col. 2002; microfotografía cortesía de J. L. Gordon.)

mavera da origen a varias generaciones de hembras que se reproducen partenogenéticamente (de manera asexual). Sin embargo, durante el otoño se produce un tipo particular de hembra cuyos huevos dan origen a machos y hembras sexuales. Estas formas sexuales se aparean y sus huevos son capaces de sobrevivir al invierno. Cuando los huevos que pasan el invierno eclosionan, cada uno da origen a una hembra asexual.

Algunos de los misterios de este tipo de desarrollo fueron resueltos en 1909 por Thomas Hunt Morgan (antes de comenzar a trabajar con las moscas de la fruta). Morgan analizó los cromosomas del áfido del pecano (del nogal americano) durante generaciones (fig. 22-5). Halló que el número diploide de los áfidos hembras es 12. En las hembras que se reproducen partenogenéticamente, solo se expulsa un cuerpo polar desde el gameto femenino en desarrollo durante la ovogénesis, de modo tal que se retiene en el huevo el número diploide de 12. Este tipo de huevo se desarrolla sin haber sido fecundado. En las hembras que dan origen a huevos que se convierten en machos o en hembras, se produce una modificación de la ovogénesis. En los huevos que producen hembras, 6 pares de cromosomas ingresan en el único cuerpo polar; de este modo, se mantiene el número diploide de 12. Sin embargo, en los huevos que producen machos, ingresa en el cuerpo polar un par de cromosomas extra. Por lo tanto, el número diploide del macho es 10. Los machos y las hembras resultantes son sexuales y producen gametos por divisiones meióticas completas. Las hembras producen ovocitos con un grupo haploide de 6 cromosomas. Sin embargo, los machos dividen sus 10 cromosomas para producir algunos espermatozoides con un número haploide de 4 y otros espermatozoides con un número haploide de 6. El espermatozoide con 4 cromosomas degenera. El espermatozoide con 6 cromosomas fecunda a los huevos para restaurar el número cromosómico diploide de 12. Estos huevos pasan el invierno y cuando eclosionan en la primavera, emergen hembras partenogenéticas.

Morgan resolvió un enigma, pero el enigma de cómo el clima otoñal regula si la hembra se reproduce en forma sexual o partenogenética sigue sin resolver. Del mismo modo, no sabemos qué regula si un ovocito diploide da origen a huevos que producen macho o hembra. Además, los mismos factores ambientales son utilizados de modos diferentes por otras especies de áfidos (Hardie 1981; Hardie y Lees 1985). Pero no se sabe cómo los cambios ambientales llegan a transformarlos hacia títulos de JH, o cómo el clima otoñal (o quizá la disminución de las ho-

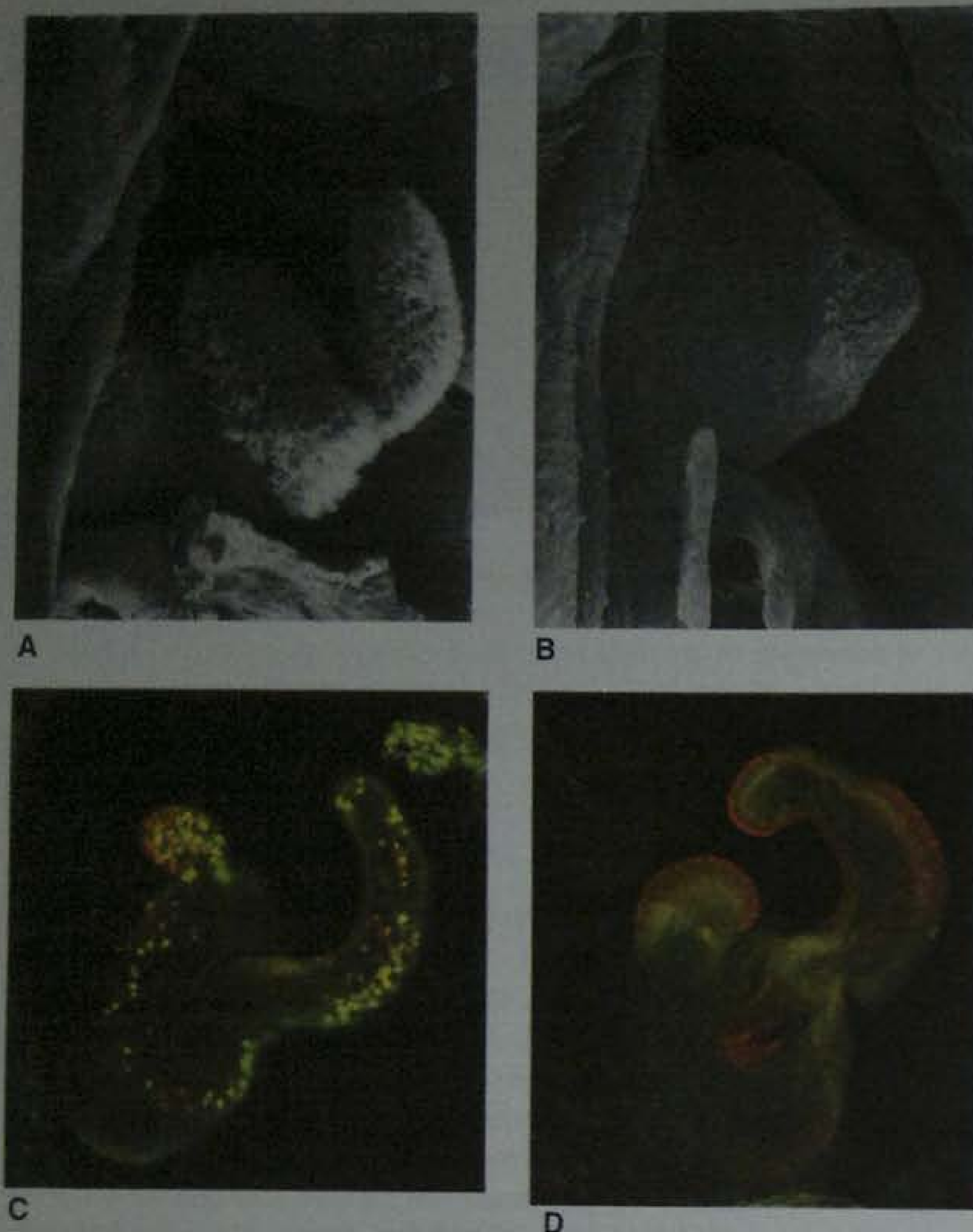


Fig. 22-2. Simbiosis en el calamar *Euprymna*. A, B. Microfotografías electrónicas de barrido del primordio del órgano de luz de un calamar *E. scolopes* juvenil de 3 días de vida. A. Órgano de luz de un juvenil sin infectar. B. Órgano de luz de un juvenil infectado con la bacteria simbiótica *V. fischeri*. Es obvia la regresión del epitelio. C. La apoptosis inducida por la bacteria se muestra mediante la tinción con acridina naranja a las 12 horas de la infección de los calamares juveniles con la bacteria. Las áreas verdes brillantes indican las regiones de muerte celular. D. Órgano de la luz de un calamar crecido en ausencia de *V. fischeri*. No se observan áreas de apoptosis. (De Montgomery y McFall-Ngai 1995; microfotografías cortesía de M. McFall-Ngai.)

libres de simbiontes desarrollan embriones que carecen de abdomen (fig. 22-3; Sander 1968; Schwemmler 1974; 1989). En *Asobara*, la bacteria le permite a la avispa completar la producción de vitelo y la maduración del huevo (Dedeinde y col. 2001). Si los simbiontes son eliminados (mediante el agregado de antibióticos), no se producen los huevos.

Incluso los mamíferos mantienen simbiosis de desarrollo con las bacterias. Las bacterias en realidad regulan algunos de nuestros genes intestinales. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa es capaz de identificar especies bacterianas que no pueden ser cultivadas y los análisis mediante micromatrices pueden mostrar cambios en la expresión de una gran población de genes. Estas técnicas han revelado una sorprendente complejidad en nuestros "seres". Los simbiontes bacterianos humanos tienen distribuciones geográficas particulares dentro de nuestro cuerpo. Las 400 o más especies de bacterias del colon humano están estratificadas en regiones específicas a lo largo de la longitud y el diámetro del tubo intestinal, donde pueden alcanzar densidades de 10^{11} células por milímetro (Savage 1977; Hooper y col. 1998). Nosotros nunca carecemos de estos componentes microbianos; los tomamos del tracto reproductivo de nuestra madre tan pronto como el amnios se rompe. Nosotros hemos coevolucionado hasta compartir nuestro espacio con ellas e incluso nos hemos codesarrollado de modo tal que nuestras células están preparadas para su acoplamiento, y sus células están preparadas para inducir la expresión génica de nuestros núcleos (Bry y col. 1996).

La expresión de los genes de mamíferos inducidos por bacterias fue demostrada en primer lugar en el intestino de ratón. Umesaki (1984) observó que una enzima fucosiltransferasa particular característica de las vellosidades intestinales del ratón fue inducida por las bacterias, y estudios más recientes (Hooper y col. 1998) han demostrado que los intestinos de los ratones libres de gérmenes pueden iniciar, pero no completar, su diferenciación. Para el desarrollo completo se necesitan los simbiontes microbianos del intestino. Los análisis mediante micromatrices de las células intestinales de ratón (fig. 22-4A; Hooper y col. 2001) han demostrado que normalmente se producen bacterias intestinales que pueden regular en más la transcripción de varios genes de ratón, incluidos los que codifican colipasa, importante en la absorción de nutrientes; angiogenina-3, que ayuda a la formación de vasos sanguíneos; y sprr2a, una proteína pequeña rica en prolina que se piensa refuerza el revestimiento del intestino. Stappenbeck y col. (2002) han demostrado que en ausencia de microbios intestinales particulares, los capilares de las vellosidades intestinales pequeñas no desarrollan una red vascular completa (fig. 22-4B,C). Los microbios intestinales también parecen ser críticos para la maduración del tejido linfoide asociado con el intestino del ratón (Cebra 1999). En resumen, los mamíferos han coevolucionado con las bacterias hasta el punto que nuestro fenotipo corporal no se desarrolla completamente sin ellas.

SITIO WEB 22.1 **Simbiosis y parasitismo del desarrollo (Developmental symbioses and parasitism).** Algunos embriones adquieren protección y nutrientes mediante la formación de asociaciones simbióticas con otros organismos. Los mecanismos por los que se forman estas asociaciones están siendo ahora esclarecidos. En otras situaciones, una especie usa el material de otra para sostener su desarrollo. Los mosquitos que succionan sangre son ejemplos de tales parásitos.

Asentamiento larval

Las señales ambientales son críticas para la metamorfosis en muchas especies y algunos de los ejemplos mejor

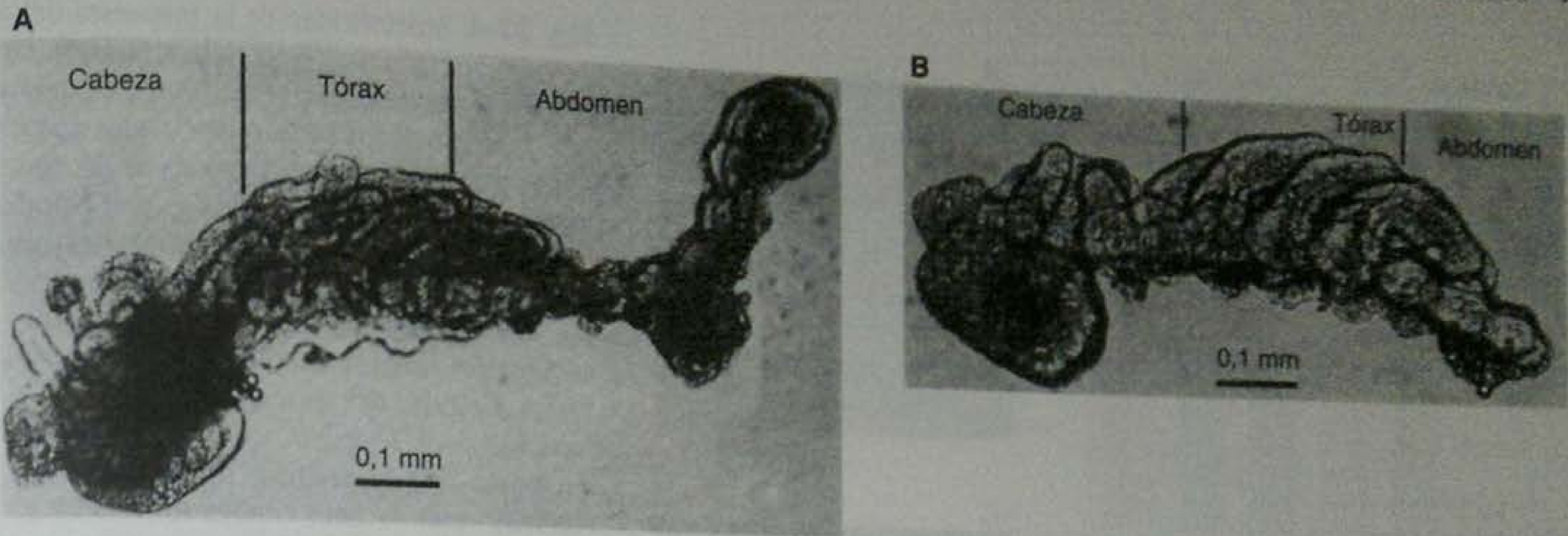


Fig. 22-3. Los simbiontes microbianos son necesarios para la formación del intestino en el cicadélido *Euscelis incisus*. **A.** Embrión control, con simbiontes, que ha formado un intestino normal. **B.** Embrión anormal, deficiente de intestino, formado después que los antibióticos han eliminado la mayor parte de la bacteria simbiótica del huevo. (De Schwemmler 1974; microfotografías cortesía de W. Schwemmler.)

estudiados son las señales de asentamiento utilizadas por las larvas marinas. Una larva marina que nada libremente a menudo necesita establecerse cerca de una fuente de alimentos o de un sustrato firme sobre el cual pueda metamorfosearse. Por lo tanto, si la presa o el sustrato suelta moléculas solubles, estas moléculas pueden ser utilizadas por las larvas como señales para establecerse y comenzar la metamorfosis. En los moluscos suele haber señales muy específicas para el asentamiento (cuadro 22-2; Hadfield 1977). En algunos casos, la presa aporta las señales, mientras que en otros el sustrato libera moléculas utilizadas por las larvas para iniciar el asentamiento. Estas señales pueden no ser constantes, pero necesitan ser parte del ambiente si el desarrollo continuará* (Pechenik y col. 1998).

Las larvas de abalón rojo, *Haliotis rufescens*, se establecen solo cuando contactan físicamente con las algas rojas coralinas. Un breve contacto es todo lo que se necesita para que la larva competente deje de nadar y comience la metamorfosis. El agente químico responsable de este cambio todavía no ha sido aislado, pero un receptor que reconoce un péptido en las algas induce la metamorfosis en las larvas competentes. Las larvas que no son competentes para comenzar la metamorfosis parecen no tener este receptor. Se piensa que el receptor está ligado a una proteína G similar a las encontradas en vertebrados, y la activación de la proteína G puede ser necesaria para inducir el establecimiento y la metamorfosis de las larvas (Morse y col. 1984; Baxter y Morse 1992; Degnan y Morse 1995).

Sexo en su estación

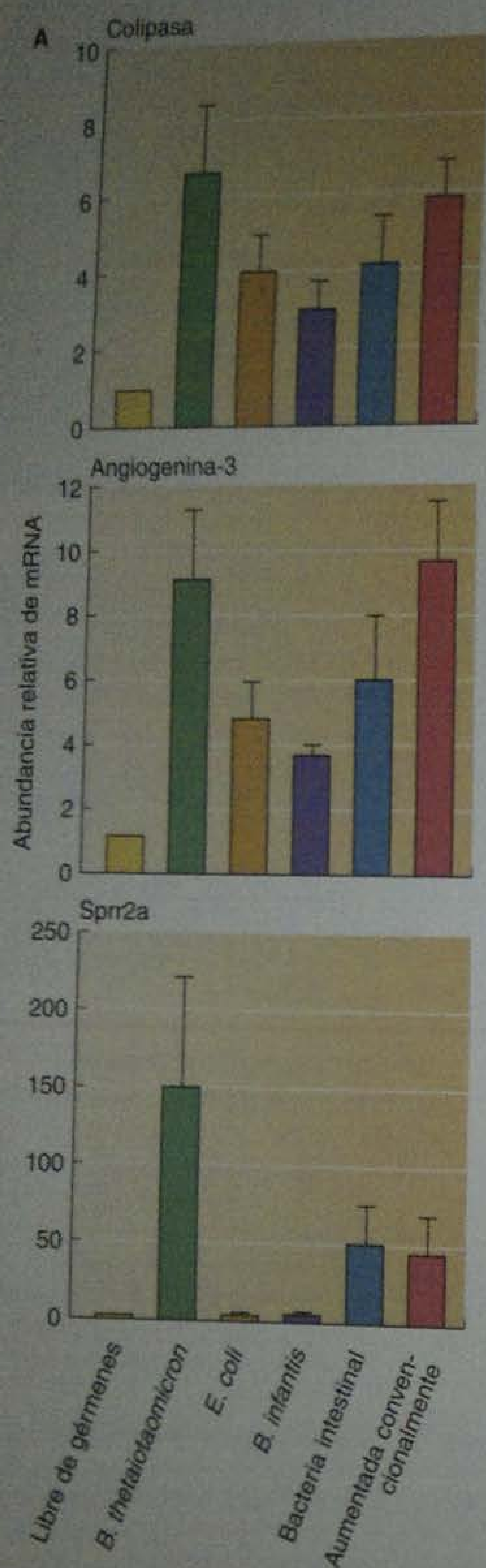
Varias especies de áfidos tienen un ciclo de vida fascinante por medio del cual un huevo eclosionado en la pri-

Cuadro 22-2 *Sustratos específicos para el asentamiento de las larvas de caracol*

Especies	*Sustrato*
Nassarius obsoletus	Lodo del hábitat adulto
Philippia radiata	*Porites lobata* (un cnidario)
Adalaria proxima	*Electra pilosa* (un briozoo)
Doridella obscura	*Electra crustulenta* (un briozoo)
Phestilla sibogae	*Porites compressa* (un cnidario)
Rostanga pulchra	*Ophlitaspongia pennata* (una esponja)
Trinchesia aurantia	*Tubularia indivisa* (un cnidario)
Elysia chlorotica	Envoltura transparente primaria de los microorganismos de un hábitat adulto
Haminoea solitaria	Envoltura transparente primaria de los microorganismos de un hábitat adulto
Aplysia californica	*Laurencia pacifica* (un alga roja)
Aplysia juliana	*Ulva* spp. (algas verdes)
Aplysia parvula	*Chondrococcus hornemanni* (un alga roja)
Stylocheilus longicauda	*Lyngbya majuscula* (una cianobacteria)
Onchidoris bilamellata	Percebes vivos

Fuente: Hadfield 1977.

* La importancia de los sustratos para el establecimiento y la metamorfosis de las larvas se demostró por primera vez en 1880, cuando a William Keith Brooks, un embriólogo en la Johns Hopkins University, se le solicitó que ayudara a la industria de las ostras de la bahía de Chesapeake aquejada de problemas. Por décadas, las ostras habían sido dragadas desde la bahía y siempre había habido una nueva cosecha para tomar de este lugar. Pero desde hace poco tiempo, cada año traía menos ostras. ¿Qué fue responsable de esta declinación? Experimentando con larvas de ostras, Brooks descubrió que la ostra americana (a diferencia de su prima europea mejor estudiada) necesitaba un sustrato fuerte sobre el que metamorfosear. Por años, los recolectores de ostras habían arrojado las conchas nuevamente hacia el mar, pero con la llegada de las aceras suburbanas, esos recolectores fueron vendiendo las conchas a las fábricas de cemento. La solución de Brooks: arrojar las conchas nuevamente a la bahía. Las poblaciones de ostras respondieron y en los muelles de Baltimore todavía se venden sus descendientes.





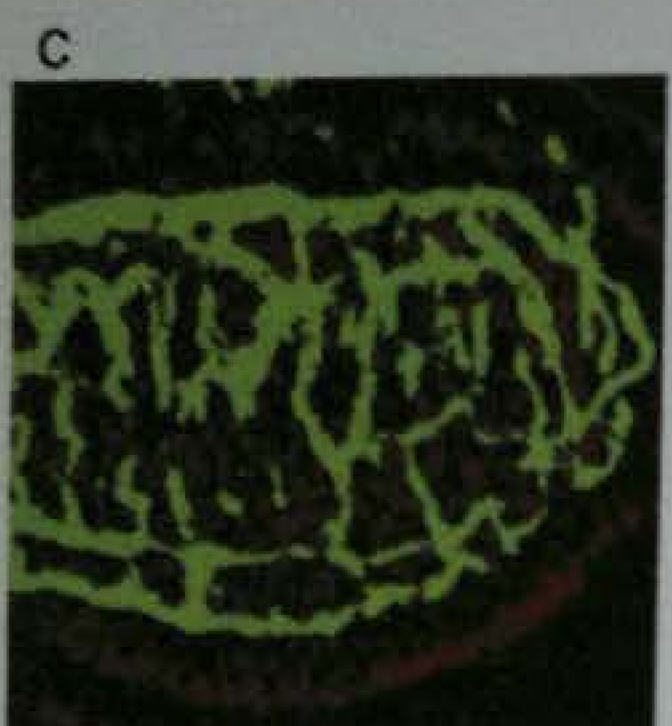


Fig. 22-4. Especificidad de la respuesta del genoma huésped a diferentes bacterias. **A.** Los ratones criados en ambientes "libres de gérmenes" fueron dejados solos o inoculados con uno o más tipos de bacterias. Después de 10 días, se aislaron sus mRNA intestinales y se estudiaron mediante micromatrices. Los ratones que crecieron en condiciones "libres de gérmenes" tenían muy poca expresión de los genes que codificaban colipasa, angiogenina-3 o sprr2a. Varias bacterias diferentes, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *E. coli*, *Bifidobacterium infantis*, y una variedad de bacterias intestinales recolectadas desde ratones criados convencionalmente, indujeron los genes para colipasa y angiogenina-3. *B. thetaiotaomicron* parece ser totalmente responsable del incremento en unas 205 veces en la expresión de *sprr2a* en los animales libres de gérmenes. **B.** Sección al microscopio confocal de un lecho capilar de una vellosidad intestinal en un ratón criado por 6 semanas en condiciones libres de gérmenes. Los capilares están teñidos de verde. **C.** Red capilar de una vellosidad intestinal de un ratón criado por 6 semanas en condiciones libres de gérmenes y luego inoculado con microbios intestinales convencionales 10 días antes de ser examinado. La red de capilares está completamente desarrollada. (A, según Hooper y col. 2001; B,C, según Stappenbeck y col. 2002; microfotografía cortesía de J. I. Gordon.)

mavera da origen a varias generaciones de hembras que se reproducen partenogenéticamente (de manera asexual). Sin embargo, durante el otoño se produce un tipo particular de hembra cuyos huevos dan origen a machos y hembras sexuales. Estas formas sexuales se aparean y sus huevos son capaces de sobrevivir al invierno. Cuando los huevos que pasan el invierno eclosionan, cada uno da origen a una hembra asexual.

Algunos de los misterios de este tipo de desarrollo fueron resueltos en 1909 por Thomas Hunt Morgan (antes de comenzar a trabajar con las moscas de la fruta). Morgan analizó los cromosomas del áfido del pecano (del nogal americano) durante generaciones (fig. 22-5). Halló que el número diploide de los áfidos hembras es 12. En las hembras que se reproducen partenogenéticamente, solo se expulsa un cuerpo polar desde el gameto femenino en desarrollo durante la ovogénesis, de modo tal que se retiene en el huevo el número diploide de 12. Este tipo de huevo se desarrolla sin haber sido fecundado. En las hembras que dan origen a huevos que se convierten en machos o en hembras, se produce una modificación de la ovogénesis. En los huevos que producen hembras, 6 pares de cromosomas ingresan en el único cuerpo polar; de este modo, se mantiene el número diploide de 12. Sin embargo, en los huevos que producen machos, ingresa en el cuerpo polar un par de cromosomas extra. Por lo tanto, el número diploide del macho es 10. Los machos y las hembras resultantes son sexuales y producen gametos por divisiones meióticas completas. Las hembras producen ovocitos con un grupo haploide de 6 cromosomas. Sin embargo, los machos dividen sus 10 cromosomas para producir algunos espermatozoides con un número haploide de 4 y otros espermatozoides con un número haploide de 6. El espermatozoide con 4 cromosomas degenera. El espermatozoide con 6 cromosomas fecunda a los huevos para restaurar el número cromosómico diploide de 12. Estos huevos pasan el invierno y cuando eclosionan en la primavera, emergen hembras partenogenéticas.

Morgan resolvió un enigma, pero el enigma de cómo el clima otoñal regula si la hembra se reproduce en forma sexual o partenogenética sigue sin resolver. Del mismo modo, no sabemos qué regula si un ovocito diploide da origen a huevos que producen macho o hembra. Además, los mismos factores ambientales son utilizados de modos diferentes por otras especies de áfidos (Hardie 1981; Hardie y Lees 1985). Pero no se sabe cómo los cambios ambientales llegan a transformarlos hacia títulos de JH, o cómo el clima otoñal (o quizá la disminución de las ho-

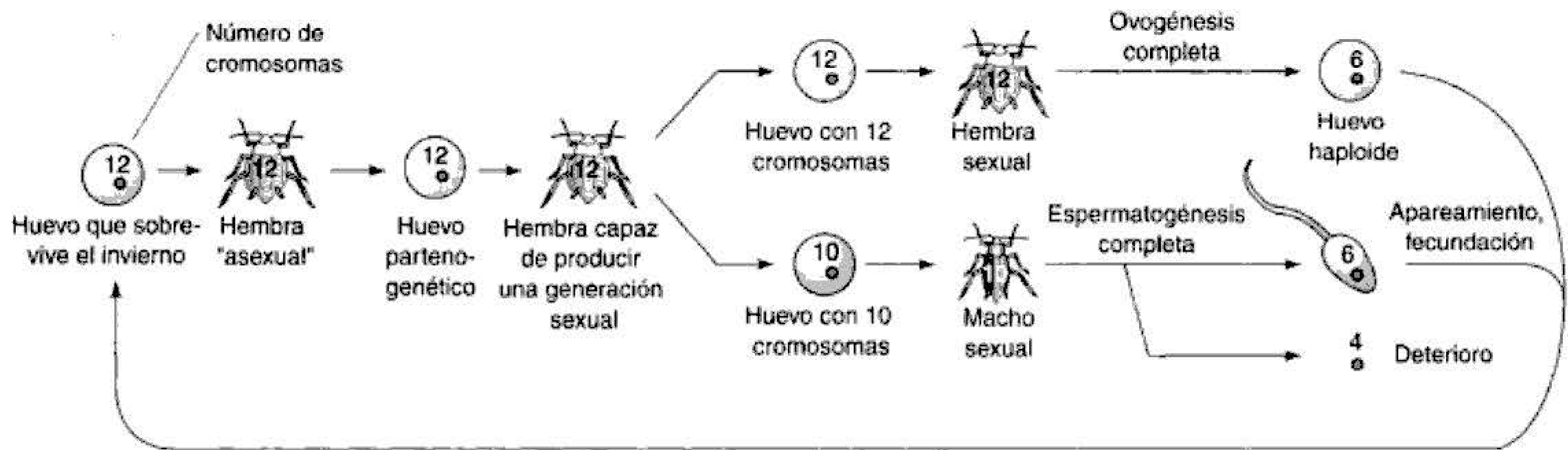


Fig. 22-5. Cambios cromosómicos durante el ciclo de vida del áfido del pecano (del nogal americano). El clima otoñal induce la producción de machos y hembras, que se aparean para producir los huevos que pasarán el invierno.

ras de luz solar) provoca los movimientos diferenciales hacia el cuerpo polar.

Diapausa: desarrollo suspendido

Muchas especies de insectos y de mamíferos han evolucionado hacia una estrategia de desarrollo denominada diapausa para sobrevivir periódicamente a condiciones severas. La **diapausa** es una suspensión del desarrollo que puede producirse en el estadio embrionario, larval, pupal o adulto, según la especie (véase cap. 18). La diapausa no es una respuesta fisiológica ocasionada por las condiciones severas. En su lugar, ésta es inducida por estímulos (como cambios en la duración de la luz del día) que *presagian* un cambio en el ambiente: las señales comienzan antes de que en realidad se originen las condiciones severas. La diapausa es especialmente importante para los insectos de las zonas templadas, y permite que sobrevivan al invierno. Los huevos del áfido del pecano (nogal americano) (mencionado antes) que sobreviven al invierno proporciona un ejemplo de esta estrategia. El desarrollo en el huevo se suspende durante esa estación, de modo que la larva no eclosiona cuando el alimento es inviable. En este caso, la diapausa se produce durante el desarrollo temprano. La polilla del gusano de seda *Bombyx mori* pasa el invierno como un embrión y entra en la diapausa justo antes de la segmentación. La polilla nocturna *Lymantia dispar* inicia su diapausa como una larva y necesita un período extenso de clima frío para terminar la diapausa; ésta es la razón por la que esta plaga no se encuentra en las regiones sureñas de Europa o de los Estados Unidos.

Cerca de 100 especies de mamíferos experimentan diapausa. Las dos estrategias más comunes de mamíferos son el retraso de la fecundación (el espermatozoide es acumulado para su posterior uso) y el retraso de la implantación (el blastocisto se mantiene sin implantarse dentro del útero y el índice de división celulares disminuye o desaparece). Algunas especies tienen diapausa *estacional*, de modo que los embriones concebidos en otoño nacerán en primavera en lugar de hacerlo en invierno; en otras especies, la diapausa es inducida por la presencia de un recién nacido que todavía se alimenta con leche. En el canguro tammar, *Macropus eugenii*, la diapausa puede estimularse mediante la prolactina liberada inducida por la succión, pero ésta también puede ser inducida por la prolactina sintetizada en respuesta a cambios en la duración del día. En ambos casos, la progesterona parece ser la señal que restaura la implantación y el crecimiento embrionario. Diferentes grupos de mamíferos utilizan diferentes hormonas para inducir o interrumpir la diapausa, pero el resultado es el mismo: la diapausa prolonga el período de gestación y permite que se produzca el apareamiento y que los jóvenes nazcan en los momentos y estaciones apropiados al hábitat de esta especie (Renfree y Shaw 2000).

SITIO WEB 22.2 **Efectos ambientales complejos sobre el desarrollo (Complex environmental effects on development).** Los ciclos de vida de ciertos insectos son controlados por varias señales ambientales cuya intersección proporciona un delicado mecanismo temporal.

SITIO WEB 22.3 **Mecanismos de la diapausa (Mechanisms of diapause).** La luz y la temperatura son críticos para la inducción y el mantenimiento de la diapausa. Diferentes especies utilizan diferentes señales para este acontecimiento.

Plasticidad fenotípica: control del desarrollo por las condiciones ambientales

Polifenismo y normas de reacción

En la mayoría de las interacciones de desarrollo, el genoma proporciona las instrucciones específicas, mientras que el ambiente es permisivo. Los perros generarán perros y los gatos engendrarán gatos, incluso si ellos viven en la misma casa. Sin embargo, en la mayor parte de las especies hay ejemplos en el desarrollo en los que el ambiente desempeña un papel instructivo y el genoma es simplemente permisivo. La capacidad de un individuo

para expresar un fenotipo en una serie de circunstancias y otro fenotipo en otra serie se denomina **plasticidad fenotípica**.*

Hay dos tipos principales de plasticidad fenotípica: polifenismo y normas de reacciones. Un **polifenismo** se refiere a fenotipos discontinuos ("o") provocados por el ambiente. Las langostas migratorias, por ejemplo, existen en dos formas que se excluyen mutuamente: una fase solitaria de alas cortas coloreadas de manera uniforme y un morfo gregario de alas largas coloreadas brillantemente. Las señales en el ambiente (sobre todo la densidad de población) determinan qué morfología desarrollará una langosta joven (fig. 22-6; véase Pener 1991). Del mismo modo, las ninfas de chicharrita (planthoppers), según su ambiente, pueden desarrollarse de dos modos. Densidades de población altas y la presencia de ciertas comunidades de plantas llevan a la producción de insectos migratorios, en los que el tercer segmento torácico produce una gran ala posterior. Las densidades bajas y otros alimentos de plantas llevan al desarrollo de chicharritas sin ala, en las que el tercer segmento torácico se desarrolla hacia un ala vestigial tipo halterio (Raatikainen 1967; Denno y col. 1985). Los cambios estacionales del color del pelaje en los animales de la región ártica son otro ejemplo de polifenismo.†

En otros casos, el genoma codifica un *rango* de fenotipos potenciales, y el ambiente selecciona el fenotipo que, en general, es el más adaptativo. Por ejemplo, un trabajo constante e intenso puede hacer que nuestros músculos alcancen un mayor tamaño; pero hay un límite definido genéticamente hasta dónde es posible la hipertrofia muscular. De modo semejante, el microhábitat de las salamandras jóvenes puede llevar a que cambie su color (de nuevo, dentro de límites definidos genotípicamente). Tales rangos de condiciones que pueden ser expresadas por un único genotipo a través de un rango de condiciones ambientales se denomina **norma de reacción** (Woltereck 1909; Schmalhausen 1949; Stearns y col. 1991). La norma de reacción es, por lo tanto, una propiedad del genoma y también puede ser seleccionada. Se espera que diferentes genotipos difieran en la dirección y en el nivel de plasticidad que son capaces de expresar (Gotthard y Nylin 1995; Via y col. 1995).

Polifenismo estacional en las mariposas

Dos ejemplos espectaculares de polifenismo se describieron en el capítulo 3. Los dos fenotipos de la mariposa *Araschnia levana* son tan diferentes que Linnaeus las clasificó como dos especies distintas (véase fig. 3-3), y el fenotipo de la polilla *Nemoria arizonaria* depende de su dieta (véase fig. 3-4). Este tipo de polifenismo no es común entre los insectos. A lo largo de la mayor parte del hemisferio norte, se puede ver polifenismo en las mariposas de la familia Pieridae (blancas del repollo) entre los individuos que eclosionan durante los días largos de verano y los que eclosionan al comienzo de la estación en los días cortos y más fríos de primavera. Los pigmentos de las alas posteriores de las mariposas que se forman en los días más cortos son más oscuros que los de los días más largos. Esta pigmentación tiene una ventaja funcional durante los meses fríos de primavera: los pigmentos oscuros absorben la luz del sol de modo más eficiente que los más claros y elevan más rápidamente la temperatura del cuerpo (fig. 22-7; Shapiro 1968, 1978; Watt 1968, 1969; Hoffman 1973; véase además Nijhout 1991).

En las zonas tropicales del mundo, hay a menudo una estación de calor húmedo y una estación de frío seco. En

* La capacidad de las señales ambientales para inducir cambios fenotípicos debería ser considerada "inducción terciaria". La inducción primaria involucra el establecimiento de un solo campo dentro del embrión (como un cigoto que da origen a solo un embrión). La inducción secundaria se refiere a las cascadas de acontecimientos inductivos dentro del embrión por las que se forman los órganos. La inducción terciaria es la inducción de los cambios del desarrollo por factores ambientales.

† Aunque el polifenismo estacional suele ser considerado adaptativo, hay momentos cuando éste no incrementa la aptitud física del organismo. Por ejemplo, el fotoperíodo puede causar que el color de la liebre cambie de marrón a blanco, pero si no está nevando, la liebre será muy llamativa sobre el fondo oscuro.

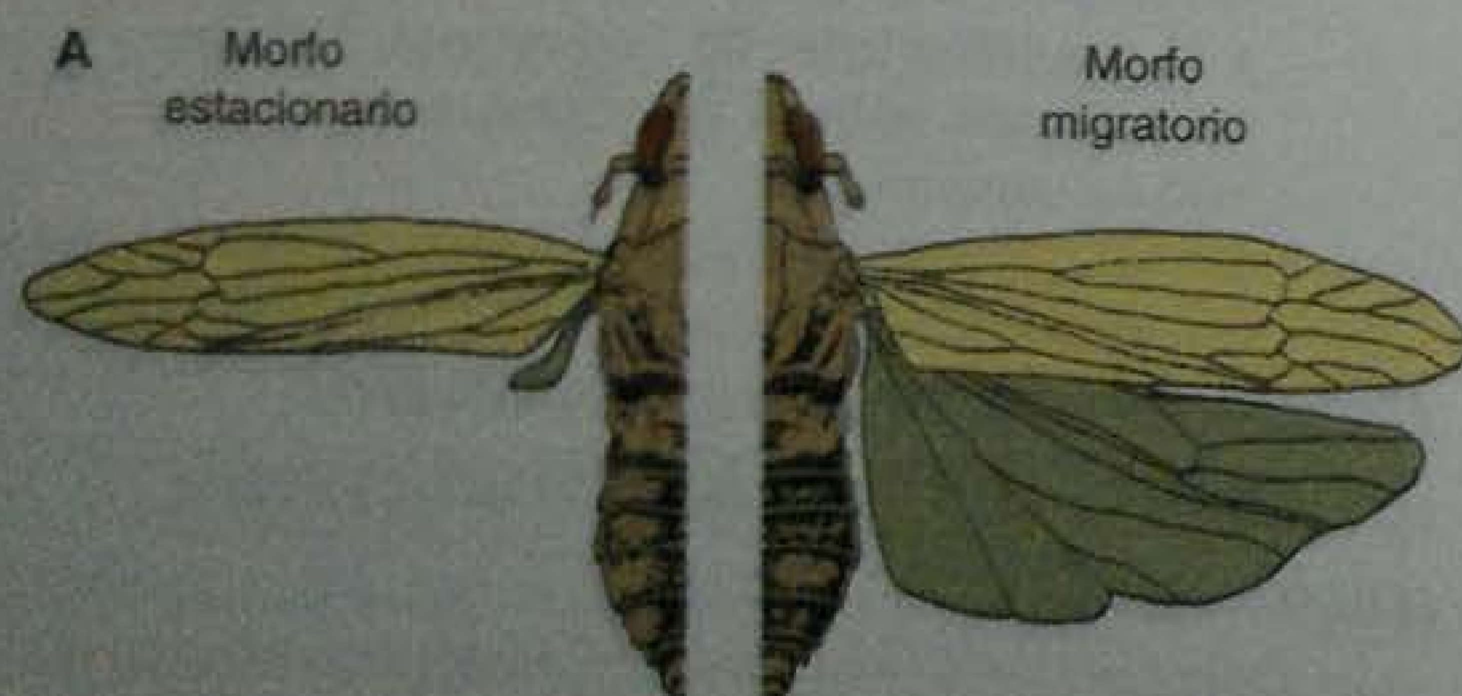






Fig. 22-6. Polifenismo inducido por la densidad en chicharritas *(planthoppers)* y saltamontes *(grasshopper)*. A. Diagrama compuesto que muestra las formas de alas cortas (izquierda) y alas largas (derecha) del saltamontes *Prokelisia marginata*. El morfo migratorio de alas largas es un excelente insecto volador; el morfo de alas cortas no puede volar. B, C. Cambios inducidos por la densidad en la "plaga de la langosta" *Schistocerca gregaria*. B. Morfo de baja densidad, que muestra pigmentación verde y alas en miniatura. C. Morfo de alta densidad, que muestra nueva pigmentación, y desarrollo de ala y de pata. (A, según Denno y col. 1985; B, C de Tawfik y col. 1999, fotografías cortesía de S. Tanaka.)

África, la mariposa Malawiana *Bicyclus anynana* tiene un polifenismo que es adaptativo a los cambios estacionales. Esto produce dos fenotipos o **morfos**. El morfo de la estación seca (fría) es una mariposa moteada marrón y gris que sobrevive al ocultarse en las hojas muertas sobre el piso de la selva tropical. En contraste, el morfo de la estación húmeda (de calor) vuela rutinariamente. A diferencia de la forma de la estación fría, ésta tiene destacadas manchas oculares que evitan que sea atacada por aves y lagartos depredadores (fig. 22-8).

El factor que determina la pigmentación estacional de esta mariposa es la temperatura durante la pupación. Las temperaturas bajas producen un morfo de estación seca; las temperaturas altas producen un morfo de estación húmeda (Brakefield y Reitsma 1991). Los mecanismos por lo que la temperatura regula el fenotipo de *Bicyclus* están comenzando a conocerse. En los estadios larvales tardíos, la transcripción del gen *distal-less* en los discos imaginales del ala se restringe a un grupo de células que se convertirán en los centros señalizadores de cada mancha ocular. En la pupa temprana, las temperaturas más elevadas incrementan la formación de 20-hidroxiecdisona (20E; véase cap. 18). Esta hormona (de un modo todavía no descrito) mantiene y expande la expresión de *distal-less* en aquellas regiones del disco imaginal del ala. (Brakefield y col. 1996; Koch y col. 1996). Se cree que la proteína Distal-less es la señal activadora que determina el tamaño de la mancha (fig. 22-9). En la estación seca, las temperaturas frías impiden la acumulación de 20E en la pupa y no se sostiene el centro de señalización de Distal-less. Ante la ausencia de la señal de Distal-less, las manchas oculares no se forman.



Fig. 22-7. Variación polifénica en las mariposas *Pontia* (Pieridae). La fila superior muestra los morfos de verano: hembra (izquierda) y macho (centro) de *P. protodice*; macho de *P. occidentalis* (derecha). La fila inferior muestra los morfos de primavera: hembra (izquierda) y macho (centro) de *P. protodice*; macho (derecha) de *P. occidentalis*. (Fotografía cortesía de T. Valente.)

La importancia de las hormonas para mediar las señales ambientales que controlan el fenotipo de las alas ha sido documentada en la mariposa *Araschnia* mencionada en el capítulo 3. *Araschnia* desarrolla fenotipos alternativos según si el cuarto o quinto instar (período) experimenta un fotoperíodo (horas de luz diurna) que es más largo o más corto que la duración de un día crítico particular. Por debajo de la duración de este día crítico, los niveles de ecdisona son bajos y la mariposa que eclosiona desde su pupa tiene las alas anaranjadas características de las mariposas de verano. Por arriba de este punto crí-

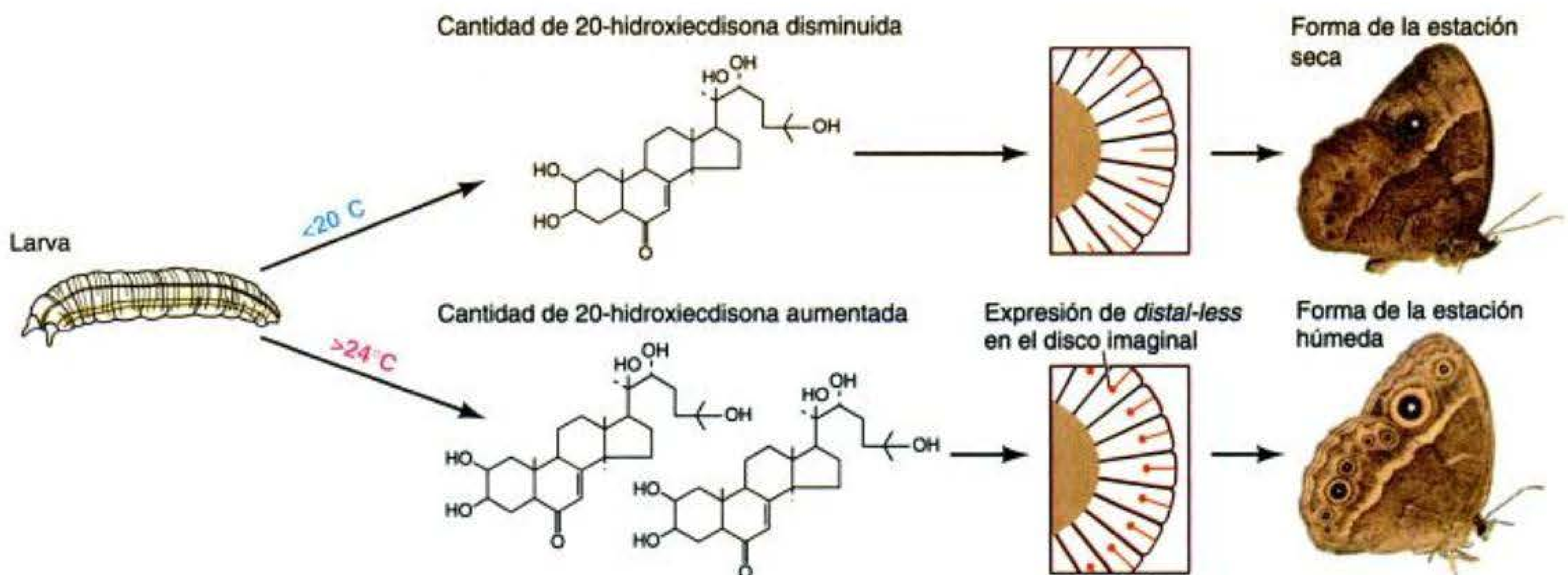


Fig. 22-8. La plasticidad fenotípica en *Bicyclus anynana* está regulada por la temperatura. Las elevadas temperaturas (en condiciones salvajes o de laboratorio) permiten la acumulación de 20-hidroxiecdisona (20E), una hormona que es capaz de mantener la expresión de *Distal-less* en el disco imaginal pupal. La región de expresión de *Distal-less* se convierte en el centro de cada mancha ocular. En los climas más fríos, en donde no se forma 20-hidroxiecdisona, comienza la expresión de *Distal-less* pero no se mantiene y no se forman las manchas con forma de ojo. (Fotografía cortesía de S. Carroll y P. Brakefield.)

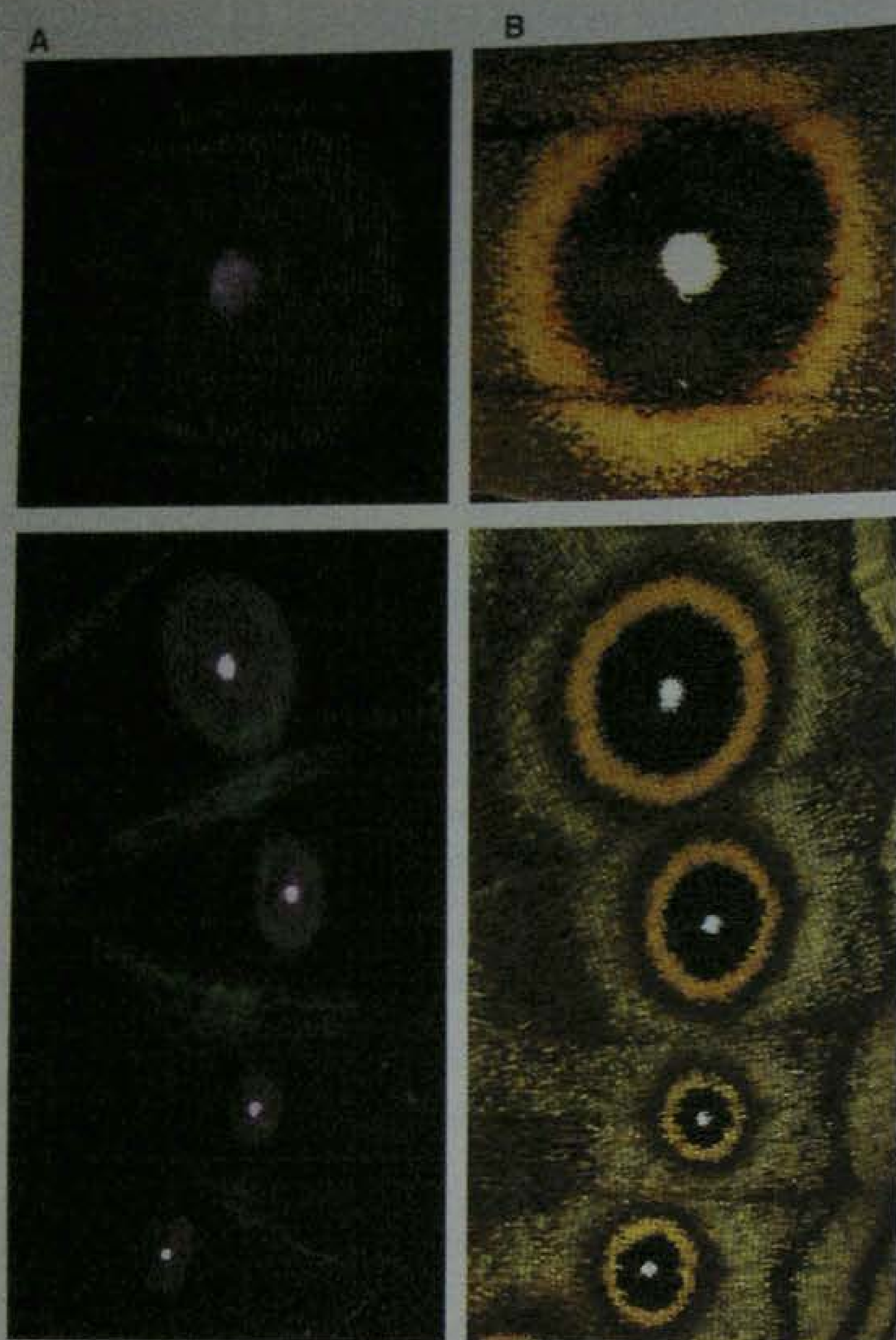


Fig. 22-9. Las proteínas Distal-less y Spalt definen áreas concéntricas que corresponden a los anillos concéntricos de las manchas con forma de ojo del adulto. A. Los factores de transcripción Distal-less (violeta), Spalt (verde) y su superposición (blanco) definen las áreas de expansión del disco imaginal del ala pupal que corresponden a las escamas coloreadas del adulto. B. Porción ventral del ala posterior de un adulto *Bicyclus*, que muestra cuatro de las siete manchas con forma de ojo y una voluminosa mancha con forma de ojo del ala anterior. (Según Brunetti y col. 2001; fotografías cortesía de S. Paddock y S. B. Carroll.)

tico, la ecdisona es producida y se forma la pigmentación de verano. La forma de verano puede ser inducida en las pupas en diapausa (primavera) mediante la inyección de 20E en las pupas. Además, mediante la alteración de los tiempos de estas inyecciones, se puede generar una serie de formas intermedias no vistas en el salvaje (fig. 22-10; Koch y Bückmannn 1987; Nijhout 2003).

SITIO WEB 22.4 **Polifenismos en mariposas (Polyphenisms in butterflies).** Las señales ambientales parecen ser sensadas por el sistema nervioso y transmitidas a través del cuerpo por la hormona juvenil o la ecdisona.

Polifenismo nutricional

No todos los polifenismos son controlados por las estaciones. En las abejas, el tamaño de la larva hembra en su muda metamórfica determina si el individuo será un obrero o una reina. Una larva que se alimenta de nutrientes ricos en "jalea real" retiene su actividad o su cuerpo alado durante su último estadio instar. La hormona juvenil secretada por estos órganos retrasa la pupación, lo que permite que la abeja resultante emerja más grande y (en algunas especies) más especializada en su anatomía (Brian 1974, 1980; Plowrigth y Pendrel 1977). Los niveles de hormona juvenil en las larvas destinadas a convertirse en reinas son 25 veces más elevados que en las larvas destinadas a convertirse en obreras, y la administración de hormona juvenil a las larvas obreras puede transformarlas en reinas también (Wirtz 1973; Rachinsky y Hartfelder 1990). Utilizando la tecnología de macromatrices de DNA, Evans y Wheeler (1999, 2001) identificaron cinco genes que eran activos en larvas jóvenes y en las larvas destinadas a convertirse en obreras, pero que eran reguladas en menos en aquellas larvas destinadas a convertirse en reinas. Estos genes estaban involucrados en el control de los índices metabólicos y en la sensibilidad a las hormonas.

Del mismo modo, las colonias de hormigas son predominantemente hembras y éstas pueden ser extremadamente polimórficas. Las hembras reproductoras ("gines" o "reinas") tienen ovarios funcionales y alas; las obreras no. Estas estrictas diferencias en la anatomía y en la fisiología son reguladas mediante la hormona juvenil (Passera 1985; Wheeler 1991). La influencia del ambiente sobre los niveles de hormona y la expresión génica en hormigas fue analizada por Abouheif y Wray (2002), quienes hallaron que los niveles de hormona juvenil inducidos por la nutrición regulaban la formación del ala.

La determinación de castas en la hormiga *Pheidole morrisi* tiene tres estadios principales. En primer lugar, los machos son diferenciados de las hembras en la fecundación. Los machos son derivados de huevos sin fecundar. La larva haploide así formada da origen a machos adultos alados y, desde el punto de vista reproductivo, activos. Las hembras son derivadas de huevos fecundados, pero el ambiente provoca una de las tres formas de hembras morfológicamente distintas. El segundo punto de cambio se produce durante la embriogénesis. Si un embrión diploide experimenta temperaturas bastante elevadas y días de larga duración, los niveles de hormona juvenil en la larva resultante serán elevados y la larva formará un adulto alado, reproductivamente activo. Si el embrión no experimenta esta elevación estacional en la hormona juvenil, éste se convierte en un obrero. El tercer punto de cambio involucra la nutrición de la larva. Si las larvas obreras son bien alimentadas, experimentan una elevación en la hormona juvenil y se convertirán en obreras principales (soldados); si no son bien alimentadas, no experimentarán un pico de hormona juvenil y llegarán a ser obreras menores (fig. 22-11A-D.)

Los niveles de hormona juvenil parecen ser críticos para la formación de las alas desde los discos imaginales. En la reina, el disco del ala anterior y del ala posterior experimenta desarrollo normal y expresa los mismos genes que los discos del ala de *Drosophila* (fig. 22-11E-J; véase cap. 18). Sin embargo, en los discos imaginales del ala de las obreras, algunos de estos genes no son expresados. Los discos imaginales del ala posterior de los soldados y de las obreras menores no expresan *engrailed* (necesario para la compartimentalización anteroposterior), *wingless*

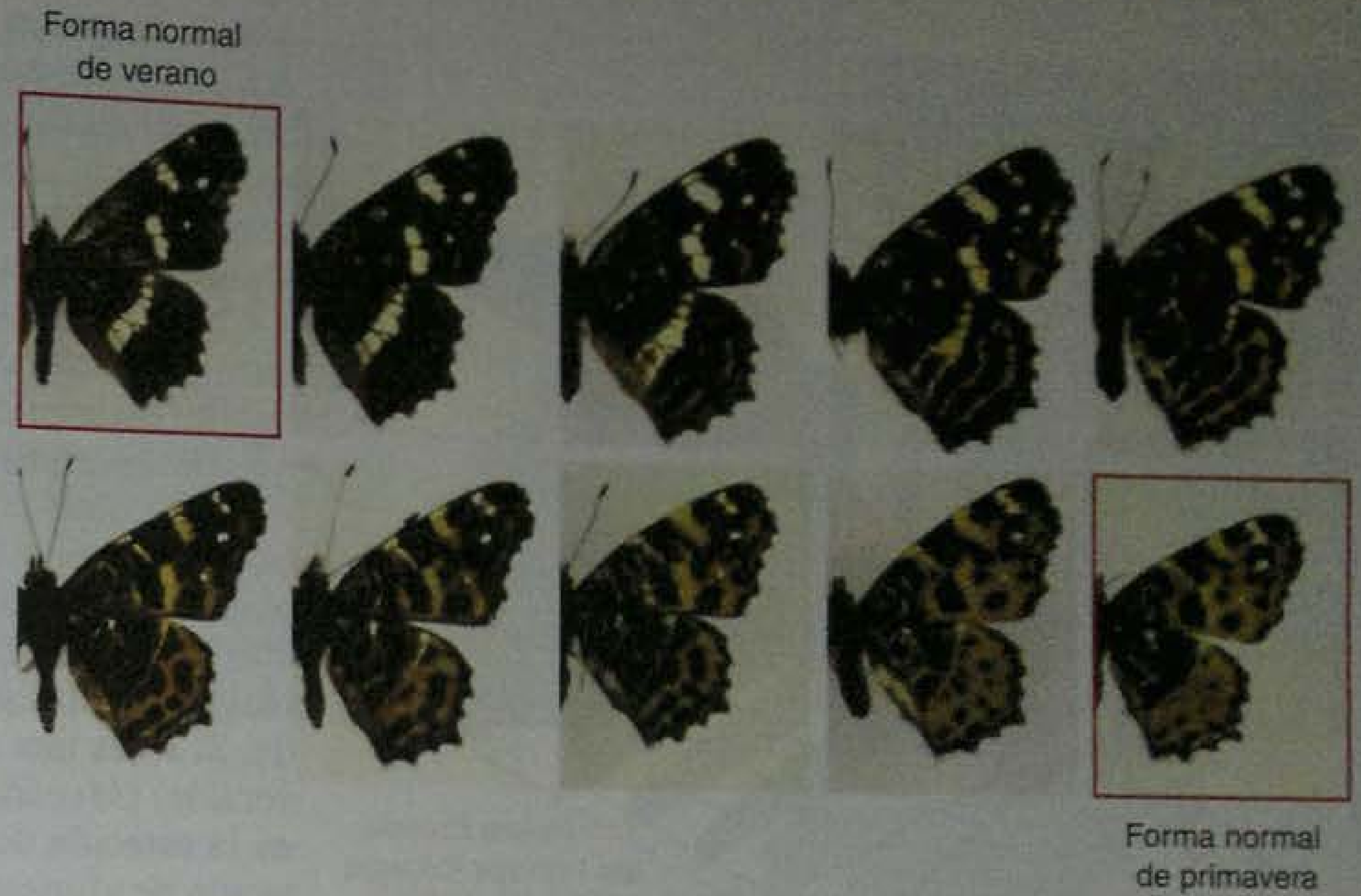


Fig. 22-10. La regulación hormonal media la pigmentación de *Araschnia* controlada por el ambiente. En el salvaje, diferentes generaciones experimentan fotoperiodos significativamente diferentes. En los fotoperiodos cortos (por debajo de la duración del día crítico), no hay pulso de 20E durante la pupación temprana y se genera la forma de primavera de la mariposa. Cuando estas mariposas de primavera se aparean, las larvas experimentan un largo fotoperiodo y generan la pigmentación de verano. En el laboratorio, las inyecciones de 20E en diferentes momentos durante la pupación pueden inducir ambos fenotipos no vistos en el salvaje. (De Nijhout 2003; fotografía cortesía de H. F. Nijhout.)

(necesario para el crecimiento y la especificación del margen del ala) o *spalt* (que ayuda a convertir la información anteroposterior hacia un ala de adulto). Por lo tanto, el ala posterior no se forma en ambos grupos de obreras. En las obreras principales (soldados), los discos imaginales del ala anterior expresan todos los genes excepto *spalt*. El resultado es un ala anterior malformada y no funcional. El disco imaginal del ala anterior de las obreras menores no expresa *wingless*, *engrailed* o *spalt*, lo que resulta en la completa ausencia de las alas. Abouheif y Wray (2002) también hallaron que aunque el resultado final –reinas aladas y obreros sin alas– es el mismo en numerosas especies de hormigas, los genes reales que regulan en menos en las obreras difieren de una especie a la otra.

SITIO WEB 22.5 **Polifenismo nutricional en el escarabajo del estiércol (Nutritional polyphenism in the dung beetle).** La forma del macho del escarabajo del estiércol es controlada por la cantidad de estiércol que ésta come como larva. Esta provisión materna de alimento determina el nivel de hormona juvenil y la hormona juvenil afecta el crecimiento de los discos imaginales. El creci-

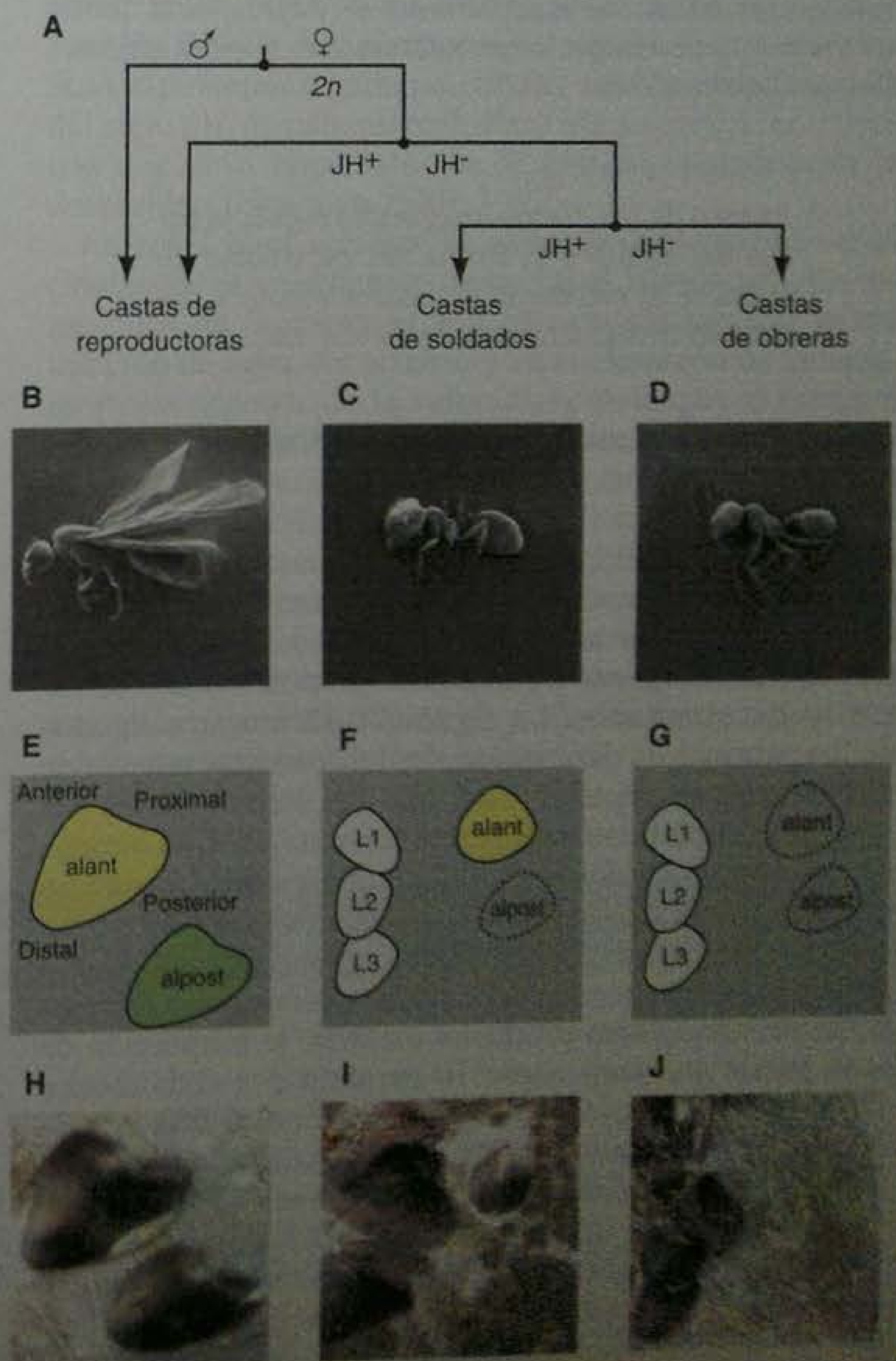


Fig. 22-11. Polifenismo y diferencias de expresión génica en la hormiga *Pheidole morisi*. A. Determinación de casta en tres puntos de cambio durante el desarrollo. En el punto de la determinación sexual, los huevos fecundados se convierten en hembras y los huevos sin fecundar se convierten en machos. El segundo punto de cambio es regulado por el ambiente. Los embriones hembra que experimentan altas temperaturas y fotoperiodos más largos experimentan niveles elevados de hormona juvenil (JH) y se vuelven reinas aladas y activas desde el punto de vista reproductivo B. Los embriones que no experimentan estas condiciones se vuelven obreras. El tercer cambio involucra la nutrición de la larva. Las larvas que están bien alimentadas se convierten en las obreras principales (soldados) con alas anteriores vestigiales (C), y las larvas que no están bien alimentadas se convierten en obreros menores con una ausencia total de alas (D). E-G. Localizaciones en cada casta de los discos del ala anterior (alant), de los discos del ala posterior (alpost) y de los discos de la pata (L1-3). Los discos que muestran alguna expresión génica están indicados en blanco. H-J. Hibridación in situ que muestra la expresión de la proteína Engrailed en estos discos imaginales. Los discos del ala en las larvas de reina expresaban todos estos genes. Las larvas soldado no expresaban ninguno de estos genes en el disco del ala posterior y expresaban ectópicamente *spalt* (zona de expresión no medial) en el disco del ala anterior. La larva de obrera menor no expresó ninguno de estos genes en el disco del ala posterior ni en el del ala anterior. (Según Abouheif y Wray 2002; fotografías cortesía de E. Abouheif.)

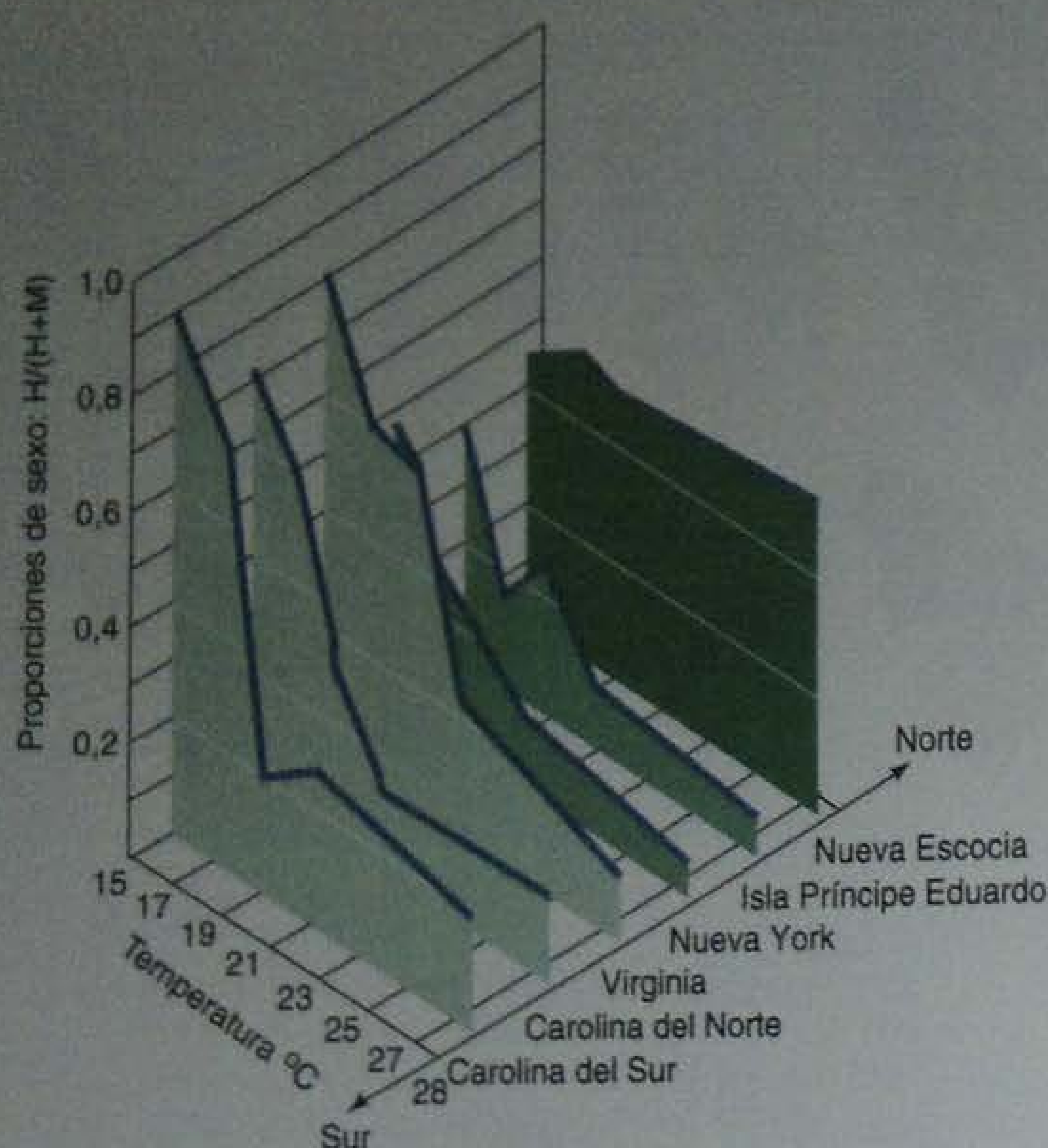


Fig. 22-12. Relación entre la temperatura durante el período de la determinación sexual y la proporción sexual (H:[H+M]) en *Menidia menidia*. En los peces recogidos más al norte de este ámbito (Nueva Escocia), la temperatura tuvo poco efecto sobre la determinación del sexo. Entre los peces recogidos en las localizaciones más al sur (especialmente de Virginia hasta Carolina del Sur), sin embargo, la temperatura tuvo grandes efectos. (Según Conover y Heins 1987).

miento de los discos imaginales regula la forma del adulto y la forma del escarabajo determina su estrategia de apareamiento y casi todo lo demás importante en sus vidas.

Determinación sexual dependiente del ambiente

Como se vio en el capítulo 17, hay muchas especies en las que el ambiente determina si un individuo será macho o hembra. La determinación del sexo dependiente de la temperatura en peces y reptiles ha proporcionado los casos mejor estudiados. La figura 17-23 muestra algunos de los patrones de determinación del sexo dependiente de temperatura en reptiles. Este tipo de determinación del sexo ambiental tiene ventajas y desventajas. Una ventaja es que ésta probablemente le da a la especie el beneficio de la reproducción sexual sin limitar a las especies en una proporción 1:1. En los cocodrilos, en los que las temperaturas extremas producen hembras mientras que las temperaturas moderadas producen machos, la proporción de sexo puede ser tanto como 10 hembras por cada macho (Woodward y Murray 1993). La principal desventaja de la determinación del sexo dependiente de la temperatura puede ser el estrechamiento de los límites de temperatura dentro de los que una especie puede existir. Esto significa que la polución térmica (localmente o debida al calentamiento global) puede dar la posibilidad de eliminar especies en una determinada área (Janzen y Paukstis 1991). Ferguson y Joanen (1982) especularon que los dinosaurios pueden haber tenido una determinación del sexo dependiente de la temperatura y que su desaparición súbita puede haber sido causada por un leve cambio en la temperatura que creó las condiciones por las cuales solo los machos o las hembras eclosionaron de los huevos.

Charnov y Bull (1977) sostuvieron que la determinación ambiental del sexo puede ser adaptativa en aquellos hábitat caracterizados por ser poco uniformes: un hábitat que tienen algunas regiones donde es más ventajoso ser macho y otras regiones donde es más ventajoso ser hembra. Conover y Heins (1987) proporcionaron evidencia para esta hipótesis. En ciertas especies de peces, las hembras se benefician de ser más grandes, debido a que su mayor tamaño se traduce en una fecundidad más elevada. Si se es una hembra de faneca plateada (Atlantic silverside) (*Menidia menidia*), es ventajoso nacer temprano en la estación de reproducción, ya que permitirá una estación de alimentación más larga y, por lo tanto, alcanzar un mayor tamaño. En los machos, el tamaño no tiene importancia. Conover y Heins demostraron que en el ámbito del sur de las *Menidias*, las hembras nacían verdaderamente temprano en la estación de reproducción. La temperatura parece desempeñar un papel principal en este patrón. Sin embargo, en el norte de este ámbito, las especies no muestran determinación del sexo ambiental. En su lugar, la proporción sexual 1:1 es generada en todas las temperaturas (fig. 22-12). Los investigadores especularon que las poblaciones más al norte tienen una estación breve de alimentación, de modo que para las hembras no hay ventajas en nacer temprano. Por lo tanto, los peces tienen determinación sexual ambiental en las regiones donde ésta es adapativa y determinación sexual genotípica en las regiones donde no lo es.

La temperatura no es el único factor ambiental que puede afectar la determinación sexual en los peces. Muchos peces pueden cambiar su sexo sobre la base de interacciones sociales (Godwin y col. 2002). El sexo del lábrido de cabeza azul, un pez de los arrecifes panameños, depende de su encuentro con otro pez. Si una larva de lábrido alcanza un arrecife donde un macho vive con muchas hembras, ésta se desarrolla hacia hembra. Cuando los machos mueren, una de las hembras (en general, la de mayor tamaño) se convierte en macho. En un solo un día, sus ovarios se reducen y crecen los testículos. Si la misma larva de lábrido ha alcanzado un arrecife que no tenía machos o que tenía un territorio que no está defendido por un macho, se desarrollará hacia un macho (Warner 1984). Estos cambios parecen ser mediados por neuropéptidos en el hipotálamo de estos peces (Godwin y col. 2000, 2003).

El góbido marino *Trimma okinawae* es uno de los pocos peces que pueden cambiar su sexo más de una vez y en cualquier dirección. Una hembra de góbido puede convertirse en macho si el macho del grupo muere. Sin embargo, si un macho más grande ingresa en el grupo, tales machos revierten siendo nuevamente hembras. Grober y Sunobe (1996) indujeron hembras a convertirse en machos, machos a convertirse en hembras, y hembras a convertirse en machos y luego en hembras nuevamente, simplemente mediante el cambio de sus compañeros. Un góbido puede cambiar su sexo en cerca de 4 días y estos cambios parecen ser mediados por los mismos neuropéptidos hipotalámicos que están correlacionados con la determinación sexual del lábrido.



Fig. 22-13. Polifenismo en renacuajos del sapo pie de pala, *Scaphiopus couchii*. El morfo típico es un omnívoro, generalmente se alimenta de insectos y algas. Sin embargo, cuando las lagunas es están secando rápidamente, se forma un morfo carnívoro (canibalístico). Éste desarrolla una boca amplia, músculos mandibulares más grandes y un intestino modificado para una dieta carnívora. El centro de la fotografía muestra a un renacuajo canibalístico alimentándose de un compañero de la laguna. (Fotografía © Thomas Wiewandt; dibujos cortesía de R. Ruibel.)

Polifenismos para condiciones ambientales alternativas

La mayoría de los estudios de adaptación se interesa por los papeles que desempeñan las estructuras adultas en permitir la supervivencia de los individuos, independientemente de si se encuentran en condiciones ambientales precarias u hostiles. Sin embargo, el animal en desarrollo, también, tiene que sobrevivir en su hábitat y su desarrollo debe adaptarse a las condiciones de su existencia.

El sapo pie de pala (o cavador), *Scaphiopus couchii*, tiene una estrategia sorprendente para sobrevivir en un ambiente muy severo. Estos sapos son llamados de la hibernación por los truenos que acompañan a la primera tormenta de primavera en el desierto de Sonora (Baja California). (Lamentablemente, las motocicletas producen los mismos sonidos, haciendo que los sapos salgan de la hibernación solamente para morir en el abrasador sol de Arizona.) Los sapos se crían en las lagunas temporarias formadas por la lluvia y los embriones se desarrollan rápidamente hacia larvas. Después de la metamorfosis de las larvas, los sapos jóvenes regresan al desierto, cavando en la arena hasta que las tormentas del año siguiente los inciten a salir en la búsqueda de las lagunas temporarias.

Las lagunas del desierto son charcas efímeras que pueden secarse rápidamente o persistir, según la profundidad inicial y la frecuencia de las precipitaciones. Se podrían prever dos escenarios alternativos a los que se enfrenta un renacuajo en tales lagunas: 1) la laguna persiste hasta que tuviera tiempo de metamorfosearse y de vivir, o 2) la laguna se seca completamente antes de que complete la metamorfosis y muera. Sin embargo, *S. couchii* (y varios anfibios) han evolucionado una tercera alternativa. El ritmo de su metamorfosis está controlado por la laguna. Si la laguna persiste en un nivel viable, el desarrollo continúa a su velocidad normal y los renacuajos que se alimentan de algas se desarrollan hacia sapos juveniles. Sin embargo, si la laguna se está secando y se vuelve cada vez más pequeña, algunos de los renacuajos emprenden un camino alternativo: desarrollan una boca más ancha y poderosos músculos mandibulares, que les permiten comerse (entre otras cosas) a otros renacuajos de *Scaphiopus* (fig. 22-13). Estos renacuajos carnívoros metamorfosean rápidamente, aunque en una versión más pequeña del sapo pie de pala juvenil. Pero ellos sobreviven mientras que otros renacuajos de *Scaphiopus* perecen por la desecación (Newman 1989, 1992).

La señal para acelerar la metamorfosis parece ser el cambio en el volumen de agua. En el laboratorio, los renacuajos de *Scaphiopus* son capaces de percibir la extracción de agua del acuario y su aceleración de la metamorfosis depende de la velocidad con la que se extrae el agua. El estrés inducido por el sistema de señalización de la hormona liberadora de corticotrofina parece modular este efecto (Denver y col. 1998; Denver 1999). Como en casi todos los casos de polifenismo, los cambios de desarrollo son mediados a través del sistema endocrino. Los órganos sensoriales envían una señal neural para regular la liberación de hormona. Luego, las hormonas pueden alterar la expresión génica de manera coordinada y relativamente rápida.

Información adicional y especulaciones

Asimilación genética

Hay un sacrificio a cambio para el sapo pie de pala (pala o cavador) carnívoro. Aunque los renacuajos caníbales sobreviven a la sequía, su grado de supervivencia después de la metamorfosis es mucho menor que el de los renacuajos que se desarrollaban más lentamente. Si no hay un significativo sacrificio a cambio para un morfo inducido por las condiciones ambientales hostiles, se podría esperar que éste se convierta en la forma predominante de la especie.

C. H. Waddington y I. I. Schmalhausen, de manera independiente, hicie-

ron esta predicción para explicar cómo algunas especies han evolucionado rápidamente en una dirección en particular (véase Gilbert 1994). Ambos científicos se quedaron impresionados por los callos del avestruz. La mayor parte de la piel de los mamíferos tiene la capacidad para formar callos sobre las áreas que son escoriadas por la tierra o por otras superficies.* Las células de la piel responden a la fricción mediante la proliferación. Mientras que tales ejemplos de formación de callos inducidos de manera ambiental están ampliamente generalizados, el avestruz nace con callos donde éste tocará la tierra (fig. 22-14).

Waddington y Schmalhausen postularon que debido a que las células de la piel son en realidad competentes para ser inducidas por la fricción, pueden ser inducidas también por otras cosas. A medida que los avestruces evolucionaron, apareció una mutación (o una combinación particular de alelos) que les permitió a las células de la piel responder a algunas sustancias dentro del embrión. Waddington (1942) escribió:

> *Supuestamente su piel, como la de otros animales, debería reaccionar directamente a la presión y a la fricción externas para llegar a ser más gruesa...*
> *Esta capacidad para reaccionar debe ser en sí misma dependiente de los genes... Entonces podría no ser demasiado difícil que se produzca la mutación de un gen que modificará algunas áreas en el embrión, haciéndolo de un modo tal que éste asume el control de la función de la presión externa, al interactuar con la piel tanto como para "apretar el gatillo" y dar lugar al desarrollo de la callosidades.*



Fig. 22-14. Lado ventral de un avestruz; las flechas marcan los callos. (Según Waddington 1942).

Mediante esta transferencia de inducción desde un inductor externo hacia un inductor interno, una característica que ha sido inducida por el ambiente llega a ser parte del genoma del organismo y puede ser seleccionada. Waddington denominó a este fenómeno "asimilación genética," mientras que Schmalhausen (1949) la denominó "selección estabilizadora". Ambos científicos han utilizado la embriología ortodoxa y la genética ortodoxa para explicar los fenómenos que han sido considerados casos de "herencia Lamarckiana de características adquiridas".

Un cambio desde los estímulos ambientales hacia los estímulos genéticos podría explicar la determinación del sexo en *Menidia* y la determinación de las castas en las hormigas. De modo semejante, la plasticidad previa del desarrollo de la longitud del brazo en la alimentación de las larvas de equinodermos puede haber salvado la transición desde la larva plútea (que se alimenta) hacia las larvas que no se alimentan y que carecen de brazos ciliados. Este cambio en la localización de los recursos entre las estructuras larvales y juveniles es paralelo al que se observa en las reservas de alimento en el huevo. Por lo tanto, los cambios ya presentes como adaptaciones a los recursos alimenticios externos pueden llegar a ser fijados genéticamente en las especies cuyas larvas no necesitan cazar para alimentarse (Strathmann y col. 1992).

Si la asimilación genética es la fijación genética de uno, dos o más fenotipos que han sido expresados adaptativamente, entonces las mariposas deberían ser un buen lugar para buscar futuros ejemplos. Brakefield y col. (1996) demostraron que podían fijar genéticamente los diferentes morfos del polifenismo adaptativo de *Bicyclus*, y Shapiro (1976) demostró que el fenotipo adaptativo día-corto (clima frío) de varias mariposas es el mismo que el único fenotipo producido genéticamente de especies relacionadas o subespecies que viven a mayores alturas o latitudes. Por lo tanto, la asimilación genética de los morfos producida originalmente mediante plasticidad del desarrollo puede resultar en el origen de nuevas especies (West-Eberhard 1989).

La asimilación genética puede jugar un papel importante en provocar una tendencia para los cambios evolutivos. Si un organismo hereda una norma de reacción, las vías de desarrollo que llevan a un fenotipo particular ya estaban allí y toda la evolución necesita hacer de este aporte un constante iniciador de aquellas vías. En el siguiente capítulo se discutirán algunas de las evidencias moleculares para la asimilación genética.

SITIO WEB 22.6 **Asimilación genética y fenocopias (Genetic assimilation and phenocopies).** La asimilación genética ha sido documentada en el laboratorio, donde la capacidad para reaccionar a un estímulo ambiental ha sido transferida a los inductores embrionarios.

* Hasta finales del siglo XX, los escritores podían ser reconocidos por los callos sobre sus dedos. Por lo tanto, en *La liga de los cabezas rojas* (*The Red Headed League*), Sherlock Holmes supuso correctamente que el hombre de cabeza roja había sido contratado como un copista.

Polifenismos inducidos por el depredador

Imagine un animal que se enfrenta frecuentemente con un depredador particular. Entonces se puede imaginar a un individuo que puede reconocer las moléculas solubles secretadas por el depredador y utilizar aquellas moléculas para activar el desarrollo de estructuras que harán a este individuo menos agradable al depredador. Esta capacidad para modular el desarrollo ante la presencia de los depredadores se denomina **defensa inducida por el depredador** o **polifenismo inducido por el depredador**.

Morfo típico

Morfo inducido por depredadores

Hinchado y con joroba

Cladocera (*Daphnia*)	Rotíferos (*Keratella*)	Percebes (*Chthalamus*)	Briozoo (*Membranipora*)	Molusco (*Thais*)	Carpa (*Carassius*)
40/90	18/59	11/43	9/44	Sin depredación hasta un 50% de los morfos típicos son devorados	30/100

Supervivencia (típica/inducida)

Fig. 22-15. Defensas inducidas por el depredador. Se muestran los morfos típicos (fila superior) e inducidos por el depredador (fila inferior) de varios organismos. Los números debajo de cada columna representan el porcentaje de organismos que sobreviven a la depredación cuando los individuos inducidos y no inducidos fueron expuestos a los depredadores (en varios ensayos). (Datos de Adler y Harvell 1990 y referencias allí citadas.)

Para demostrar el polifenismo inducido por el depredador, se tiene que demostrar que la modificación fenotípica es causada por la presencia del depredador y que la modificación fenotípica incrementa las aptitudes de su resistencia cuando el depredador está presente (Adler y Harvell 1990; Tollrian y Harvell 1999). Por ejemplo, varias especies de rotíferos alterarán su morfología cuando se desarrollan en el agua de lagunas en las que fueron cultivados sus depredadores (fig. 22-15; Dodson 1989; Adler y Harvell 1990). Los depredadores de rotífero *Asplanchna* liberan en el agua un compuesto soluble que induce en los huevos de una presa de rotífero de la especie *Keratella slacki*, a desarrollarse hacia individuos con cuerpos levemente más largos y espinas anteriores un 130% más largas de lo que de otro modo llegarían a ser, haciendo a la presa más difícil de comer. El caracol *Thais lamellosa* desarrolla una gruesa concha y un "diente" en su apertura cuando es expuesto a aguas con especies de cangrejos que los tienen como presas. En una población mezclada de caracoles, los cangrejos no atacarán a los caracoles más gruesos hasta que sean devorados más de la mitad de los morfos normales de caracol (Palmer 1985). La figura 22-15 muestra los morfos típicos y los inducidos por el depredador para varias especies. En cada caso, el morfo inducido es más exitoso en su supervivencia del depredador y el filtrado soluble del agua que rodea al depredador es capaz de inducir los cambios. Los químicos que son liberados por un depredador y que pueden inducir la defensa en su presa se denominan **kairomonas**.

El polifenismo inducido por el depredador de la pulga de agua partenogenética *Daphnia* no solo es beneficioso para sí mismo, sino que también lo es para sus descendientes. Cuando *Daphnia cucullata* se enfrenta a una larva depredadora de la mosca *Chaeoborus*, sus "cascos" crecen hasta el doble de su tamaño normal (fig. 22-16). Este incremento disminuye las posibilidades de que *Daphnia* sea comida por las larvas de mosca. La misma inducción del casco se produce en la *Daphnia* que es expuesta a extractos de agua en los que las larvas de mosca han estado nadando. Agrawal y col. (1999) han demostrado que los descendientes de tales *Daphnias* inducidas nacen con esta misma morfología de la cabeza alterada. Es posible que la kairomona de *Chaeoborus* regule la expresión génica en el adulto y en el embrión en desarrollo. Todavía no se sabe cómo *Daphnia* evolucionó la capacidad para producir receptores que unen kairomona o cómo hace para utilizar la kairomona para generar un cambio morfológico adaptativo.

Las colonias de invertebrados exhiben algunas respuestas espectaculares a los depredadores. Los animales sésiles no pueden escapar de los depredadores alejándose y los depredadores con frecuencia los tratan como plantas, comiendo módulos sin matar a la colonia entera. *Membranipora membranacea* es un briozoo ampliamente distribuido visto a menudo sobre el alga kelp. Ésta es comida por ciertos moluscos nudibranquios que succionan en los módulos en la periferia de la colonia. Cuando son expuestos a estos depredadores, los módulos cerca de los nudibranquios desarrollan espinas. Estas espinas interfieren en la capacidad del depredador para establecer la succión necesaria para alimentarse. Las espinas también pueden ser inducidas dentro de los tres días por el tratamiento de una colonia con extractos químicos del depredador (Harvell 1986, 1999.)

El polifenismo inducido por el depredador no está limitado a los invertebrados. La carpa *Carassius carassius* es capaz de responder a la presencia de un depredador de lucio solo si el lucio ya se ha alimentado de otro pez. La carpa crece hacia un morfo de abdomen ensanchado y jorobado que no encajará en la mandíbula del lucio. Sin embargo, como en la mayoría de las defensas inducidas por los depredadores, hay un sacrificio a cambio (de otro modo se debería esperar que el morfo inducido se convierta en el fenotipo normal). En este caso, la morfología inducida pone una resistencia en la eficiencia en la capacidad de nadar, y el pez más gordo no puede nadar tan bien (Brönmark y Pettersson 1994).

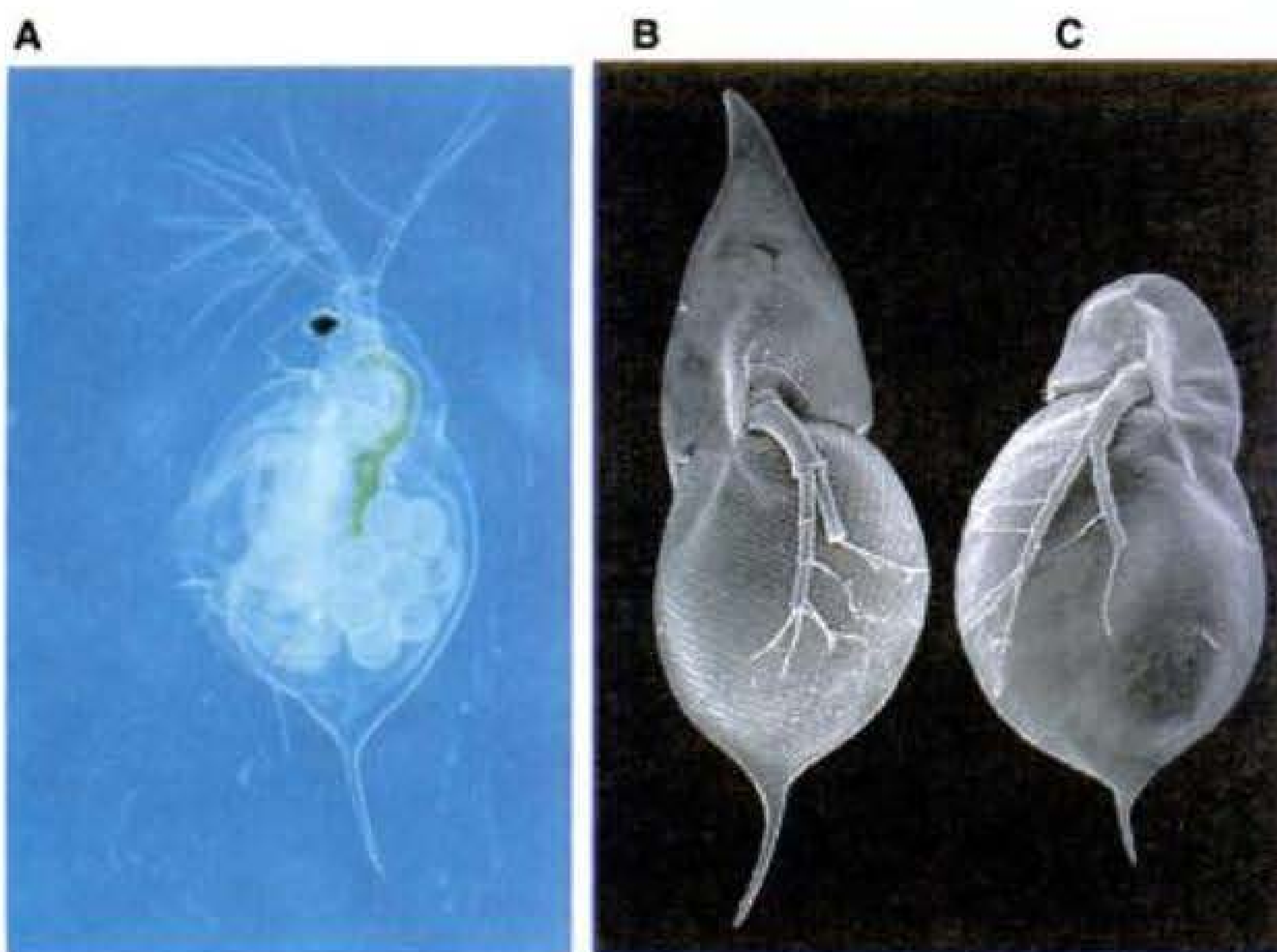


Fig. 22-16. Polifenismo inducido por el depredador en *Daphnia*. A. *Daphnia* es una especie formada solo por hembras, que producen huevos (visibles dentro del organismo adulto) partenogenogenéticamente. B, C. Microfotografías electrónicas de barrido que muestran morfos del mismo clon inducido por depredador (B) y normal (C). (A, microfotografía cortesía de R. Tollrian; B, C, microfotografías cortesía de A. A. Agrawal.)

Los polifenismos inducidos por los depredadores son abundantes entre los anfibios. Los renacuajos hallados en las lagunas o criados ante la presencia de otras especies pueden diferir significativamente de los renacuajos criados por ellos mismos en acuarios. Por ejemplo, los renacuajos recién eclosionados de la rana tropical (*Rana sylvetica*) criados en tanques que contienen la larva depredadora libélula *Anax* (confinadas en cajas enrejadas de modo tal que ellas no pueden comer los renacuajos) crecen más pequeños que aquellos criados en tanques similares pero sin los depredadores. Además, aumenta su musculatura de la cola, que les permite tener mayor velocidad para girar y nadar (van Buskirk y Relyea 1998). El agregado de más depredadores al tanque causa un continuo aumento de la aleta caudal y de la musculatura de la cola y en realidad lo que inicialmente parecía ser un polifenismo puede ser una norma de reacción que puede valorar el número (y el tipo) de depredadores.

McCollum y Van Buskirk (1996) han demostrado que ante la presencia de sus depredadores, la aleta caudal del renacuajo de la rana arbórea gris *Hyla chrysoscelis* crece hacia un tamaño mucho mayor y se vuelve roja brillante. Este fenotipo le permite al renacuajo nadar alejándose rápidamente y desviando a los depredadores a atacar hacia la región de la cola. El sacrificio a cambio es que los renacuajos no inducidos crecen más lentamente y sobreviven mejor en los ambientes libres de depredadores.

SITIO WEB 22.7 **Determinación de una casta inducible en las colonias de hormigas (Inducible caste determination in ant colonies).** En algunas especies de hormigas, la pérdida de hormigas soldados crea condiciones que inducen a más obreras a convertirse en soldados.

Información adicional y especulaciones

La inmunidad de los mamíferos como una respuesta inducida por el depredador

Si el polifenismo inducido por el depredador es una respuesta adaptativa a posibles amenazas, entonces el sistema inmune de los mamíferos es el logro más refinado. Nuestros principales depredadores son los microbios, y nuestro sistema inmune puede reconocerlos y destruirlos casi a todos. Cuando nos exponemos a una molécula extraña (denominada **antígeno**), elaboramos **anticuerpos** y los secretamos hacia el suero sanguíneo (véase cap. 4). Estos anticuerpos se unen al antígeno, inactivándolo o eliminándolo. Las bases para la respuesta inmune se resumen en cinco postulados principales de la hipótesis de la selección clonal (Burnett 1959):

1. Cada **linfocito B** (**célula B**) puede producir uno y solo un tipo de anticuerpos. Este anticuerpo es específico para solo un tipo de antígeno.
2. Cada célula B incorpora la proteína de anticuerpo que ésta genera sobre su membrana celular con el sitio de unión específica hacia afuera.
3. Los antígenos son presentados (generalmente por macrófagos) a los anticuerpos sobre las membranas de las células B.
4. Solo aquellas células que unen el antígeno pueden diferenciarse hacia **células plasmáticas** (**plasmocitos**) secretoras de anticuerpos. Las células plasmáticas se dividen repetidamente, producen abundante retículo endoplasmático rugoso y sintetizan enormes cantidades de moléculas de anticuerpos que son secretadas hacia la sangre.
5. La especificidad del anticuerpo producido por la célula plasmática es exactamente la misma que la que había sobre la superficie de la célula B desde la cual se diferenció.

El tipo de molécula de anticuerpo sobre la superficie de la célula B es determinada por azar. De los 10 millones de tipos de proteínas de anticuerpo que la célula puede posiblemente sintetizar, cada célula B produce solo un tipo. Esto es, una célula B puede estar produciendo anticuerpos que se unen

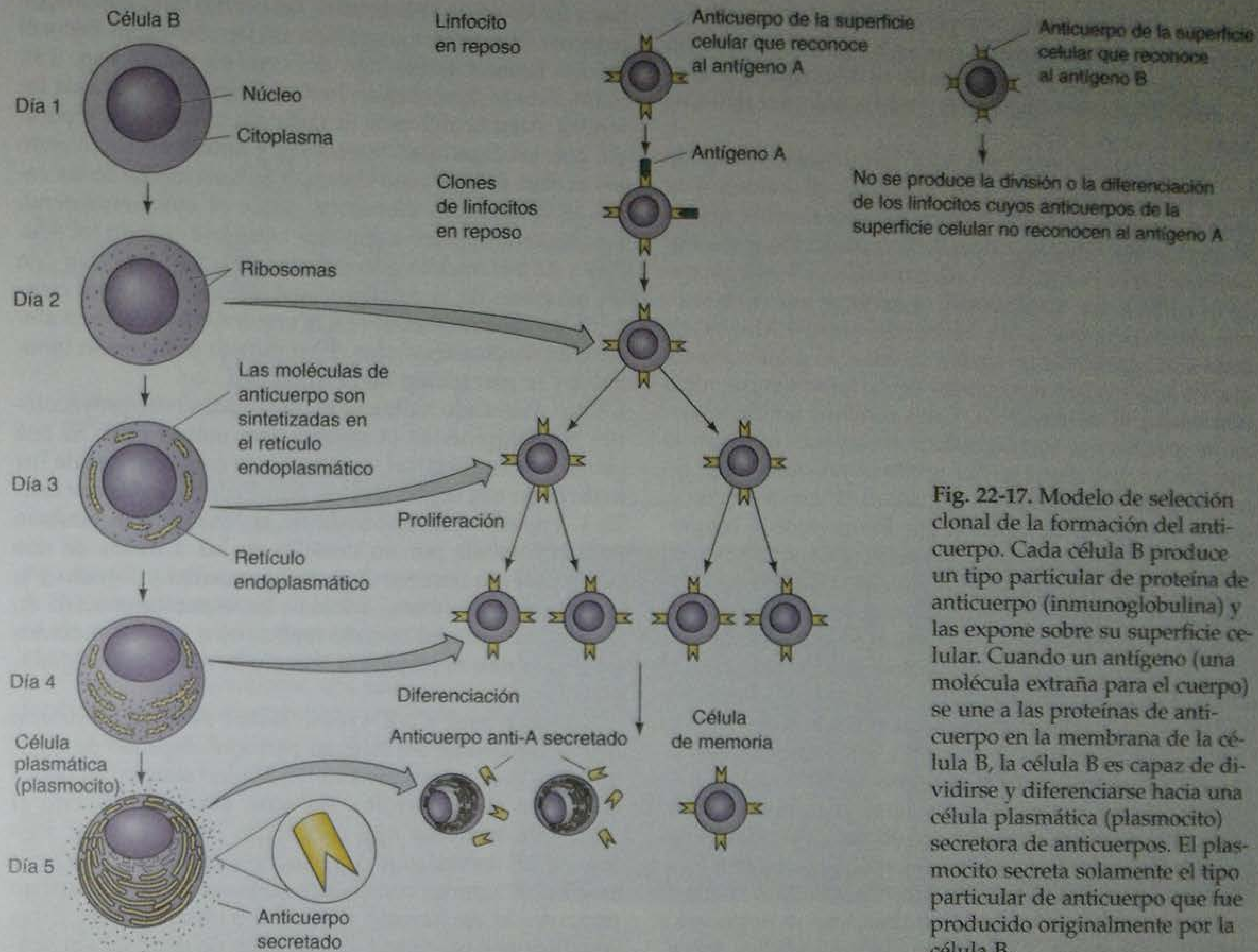


Fig. 22-17. Modelo de selección clonal de la formación del anticuerpo. Cada célula B produce un tipo particular de proteína de anticuerpo (inmunoglobulina) y las expone sobre su superficie celular. Cuando un antígeno (una molécula extraña para el cuerpo) se une a las proteínas de anticuerpo en la membrana de la célula B, la célula B es capaz de dividirse y diferenciarse hacia una célula plasmática (plasmocito) secretora de anticuerpos. El plasmocito secreta solamente el tipo particular de anticuerpo que fue producido originalmente por la célula B.

al poliovirus, mientras que la célula B vecina puede estar produciendo anticuerpos para la toxina de la difteria. Las células B están siendo creadas y destruidas constantemente. Sin embargo, cuando un antígeno se une a un grupo de células B, estas células son estimuladas a dividirse y a diferenciarse hacia células plasmáticas (que secretan el anticuerpo) y las células de memoria (que se localizan en los nódulos linfáticos y que responden rápidamente cuando son expuestas tardíamente en la vida al mismo antígeno) (fig. 22-17). Por lo tanto, la constelación de células plasmáticas y de células de memoria entre las distintas personas difiere, según qué antígenos hayan encontrado. Los gemelos idénticos tienen diferentes poblaciones de descendientes de células B en el bazo o los nódulos linfáticos. Esta defensa inducida por el depredador generada en nuestro sistema inmune es transgeneracional. El pasaje de anticuerpos a través de la placenta y la transferencia de anticuerpos a través de la leche también le da protección al recién nacido.

SITIO WEB 22.8 **La inducción de las células inmunes (The induction of immune cells).** Los detalles de la respuesta inmune de mamíferos involucran interacciones inductivas entre las células B, las células T, los macrófagos y los antígenos. El HIV mata a las células T responsables de permitir que se diferencien las células B.

Aprendizaje: un sistema nervioso que se adapta al ambiente

En el capítulo 13 se vio que la actividad neuronal puede ser un factor crítico en la decisión de qué sinapsis son conservadas por el organismo adulto. Aquí se extenderá la discusión para resaltar aquellos ejemplos destacables en los que nuevas experiencias modifican el grupo original de conexiones neuronales, causando la creación de nuevas neuronas o la formación de nuevas sinapsis entre las neuronas existentes.

La formación de nuevas neuronas

Debido a que las neuronas, una vez formadas, no se dividen, el "nacimiento" de una neurona puede ser identificado por el tratamiento del organismo con timidina ra-

diactiva. Normalmente, muy poca timidina es tomada hacia el DNA de una neurona que ya ha sido formada. Sin embargo, si durante el tratamiento se distingue una nueva neurona por división celular, ésta incorporará timidina radiactiva en su DNA.

Se ha visto que tales neuronas son generadas cuando los pájaros cantores machos aprenden sus cantos. Los pinzones cebra juveniles memorizan una canción modelo y luego aprenden el patrón de la contracción muscular necesario para cantar una frase particular. En este proceso de aprendizaje y repetición, se generan nuevas neuronas en el hiperestriado del cerebro del pinzón. Muchas de estas nuevas neuronas envían axones al arquiestriado, que es responsable del control de la musculatura vocal (Nordeen y Nordeen 1988). Estos cambios no son vistos en los machos que son demasiado viejos para aprender la canción, ni son vistos en las hembras juveniles (que no cantan estas frases). En los gorriones de corona blanca, donde la canción es regulada por fotoperíodo y hormonas, la exposición de los machos adultos a largas horas de luz y a testosterona induce cerca de 50.000 nuevas neuronas en sus centros vocales (Tramontin y col. 2000). El circuito neural del cerebro de estas aves muestra plasticidad estacional. Se cree que la testosterona incrementa el nivel del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en los centros vocales que producen el canto. Si se les da BDNF a las aves hembras, ellas también producen más neuronas allí (Rasika y col. 1999).

Las cortezas cerebrales de las ratas jóvenes criadas en ambientes con estimulación están atestadas con más neuronas, sinapsis y dendritas que las halladas en ratas criadas en aislamiento (Turner y Greenough 1983). Incluso el cerebro adulto continúa desarrollándose en respuesta a nuevas experiencias. Cuando los canarios adultos aprenden nuevos cantos, ellos generan nuevas neuronas cuyos axones proyectan desde una región vocal del cerebro hacia otra (Alvarez-Buylla y col. 1990). Los estudios sobre ratas adultas y ratones indican que la estimulación ambiental puede incrementar el número de nuevas neuronas en el giro dentado (Kempermann y col. 1997a,b; Gould y col. 1999; van Praag y col. 1999). De modo semejante, cuando las ratas adultas aprenden a mantener su equilibrio sobre clavijas, sus neuronas cerebelosas de Purkinje desarrollan nuevas sinapsis (Black y col. 1990). Por lo tanto, el patrón de conexiones neuronales es un producto del patrón heredado y del patrón producido por las experiencias. Este interjuego entre el desarrollo innato y el basado en la experiencia ha sido detallado en forma espectacular en estudios sobre la visión de mamíferos.

Cambios basados en la experiencia en las vías visuales de mamíferos

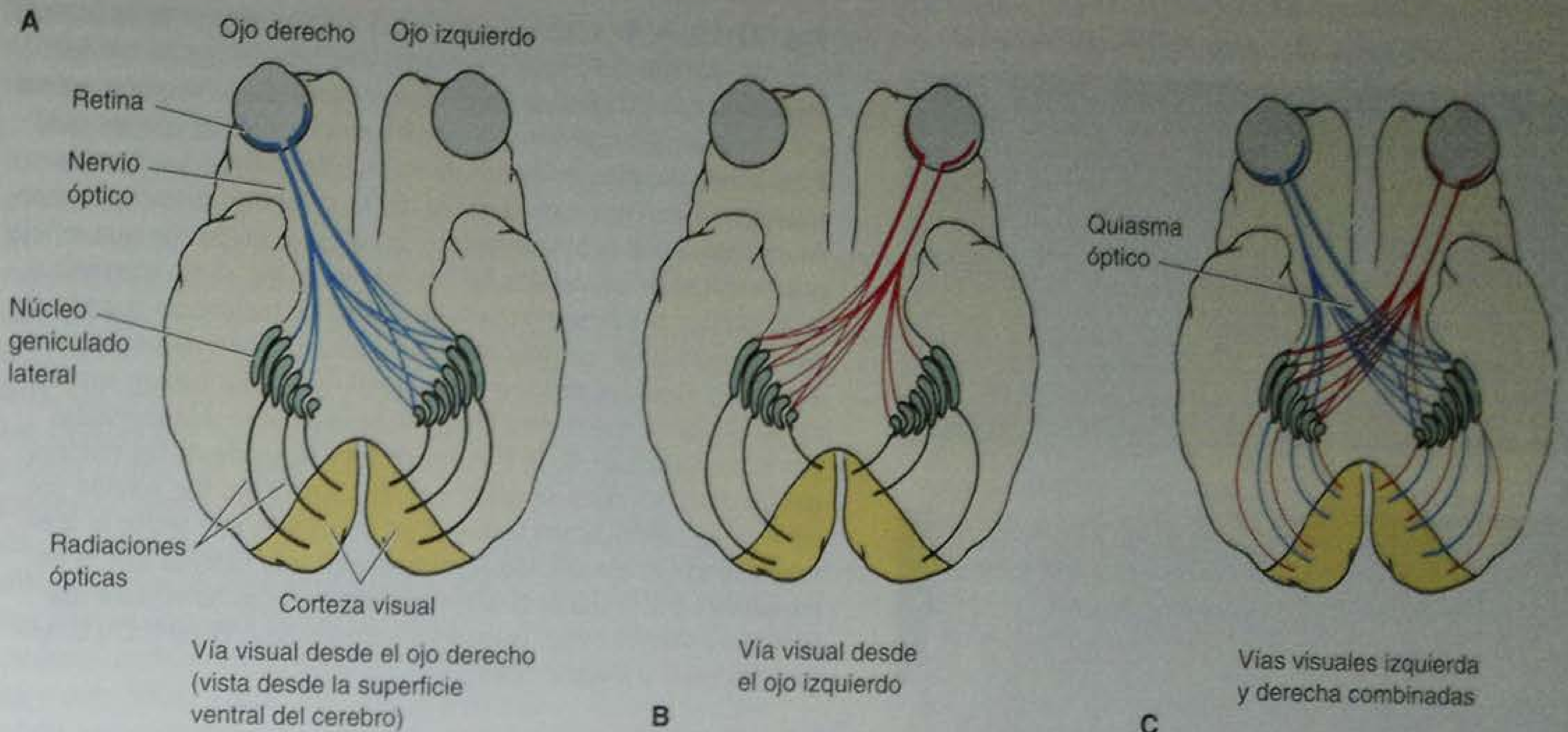
Algunas de las investigaciones más interesantes sobre el establecimiento del patrón neuronal en mamíferos tienen que ver con los efectos de la deprivación sensorial sobre el sistema visual en desarrollo en gatitos y monos. Las vías por las que el impulso eléctrico pasa desde la retina hacia el cerebro en mamíferos se muestran en la figura 22-18. Los axones desde las células ganglionares de la retina forman los dos nervios ópticos, los que se encuentran a nivel del quiasma óptico. Como en los renacuajos de *Xenopus*, algunos axones van hacia el lado opuesto (contralateral) del cerebro; pero, a diferencia de la mayor parte de los otros vertebrados, las células ganglionares de la retina de mamíferos también envían aferencias hacia el mismo (homolateral) lado del cerebro (véase cap. 13). Estos axones terminan en lo dos núcleos geniculados laterales. Aquí la aferencia de cada ojo se mantiene separada, con las capas más superiores y anteriores recibiendo los axones del ojo contralateral y la zona media de las capas recibiendo las aferencias desde el ojo homolateral. La situación se vuelve aún más compleja cuando las neuronas de los núcleos geniculados laterales conectan con las neuronas de la corteza visual. Cerca del 80 por ciento de las células neurales en la corteza visual reciben aferencias desde ambos ojos. El resultado es la visión binocular y la percepción de profundidad.

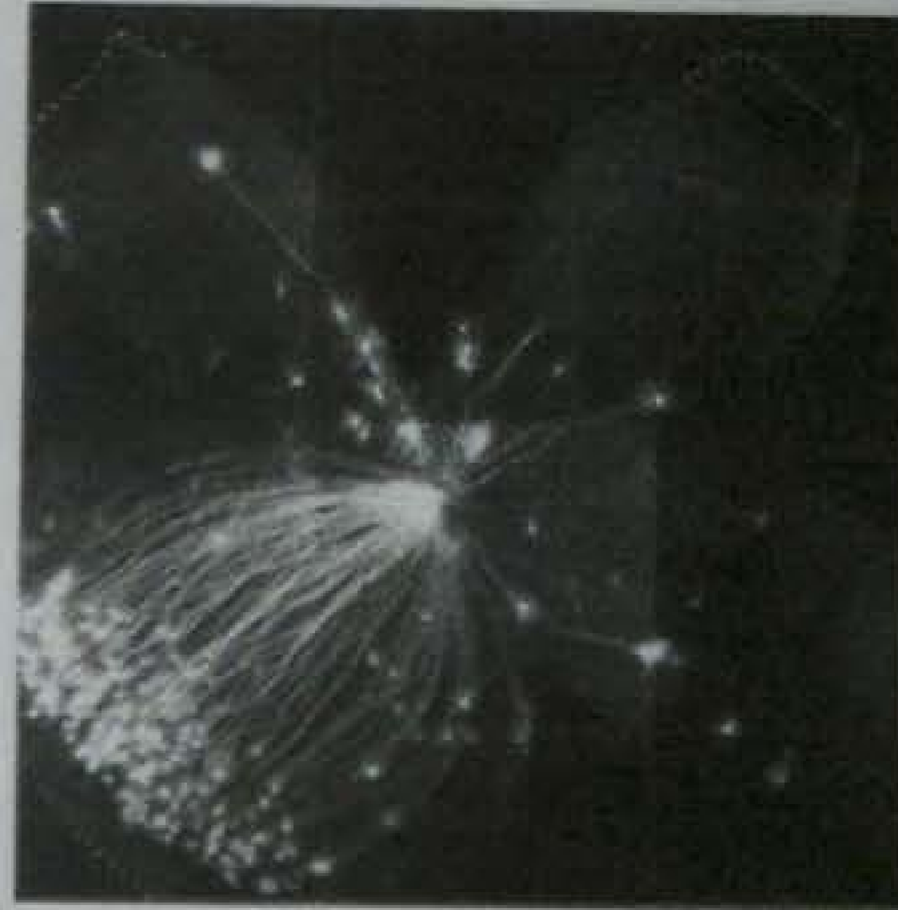
Otro destacado hallazgo es que el patrón de proyecciones retinotópicas es el mismo para ambos ojos. Si una cierta neurona cortical es estimulada con destellos de luz a través de una región del ojo izquierdo 5 grados por arriba y 1 grado a la izquierda de la fóvea,* ésta también será estimulada por un destello de luz a través de una región del ojo derecho 5 grados por arriba y 1 grado a la izquierda de la fóvea. Además, la respuesta evocada en la neurona cortical cuando ambos ojos son estimulados es mayor que la respuesta cuando la retina es estimulada sola.

Hubel, Wiesel y col. (véase Hubel 1967) demostraron que el desarrollo del sistema nervioso depende de algunos grados de experiencia del individuo durante un período crítico del desarrollo. En otras palabras, no todo el desarrollo neuronal está codificado en el genoma; algo resulta del aprendizaje. La experiencia parece reforzar o estabilizar algunas conexiones neuronales que ya estaban presentes al nacimiento y debilita o elimina otras. Estas conclusiones provienen de estudios de deprivación sensorial parcial. Hubel y Wiesel (1962, 1963) cosieron cerrando los párpados del ojo derecho de gatitos recién nacidos y los dejaron cerrados por 3 meses. Después de este momento, ellos descosieron los párpados del ojo derecho. Las neuronas corticales de estos gatitos no pudieron ser estimuladas por la luz brillante en el ojo derecho. Casi todas las aferencias hacia la corteza visual provenían del ojo izquierdo solamente. El comportamiento de los gatitos reveló la ineficiencia de su ojo derecho; cuando el ojo izquierdo de estos gatitos fue cubierto, se volvieron funcionalmente ciegos. Debido a que las neuronas del geniculado lateral parecen ser estimuladas por aferencias desde los ojos derecho e izquierdo, los defectos fisiológicos parecen estar en las conexiones entre los núcleos geniculados laterales y la corteza visual. Un fenómeno semejante ha sido observado en los monos rhesus, donde el defecto ha sido correlacionado con una carencia de síntesis de proteína en las neuronas del geniculado lateral inervadas por el ojo cubierto (Kennedy y col. 1981).

Aunque podría ser tentador concluir que la ceguera que resulta de estos experimentos fue debida a una falla para formar las conexiones visuales apropiadas, éste no es el caso. En su lugar, cuando un gatito o un mono nacen, los axones desde las neuronas del geniculado lateral reciben

* La fóvea es una depresión en el centro de la retina donde solo los conos están presentes (los bastones y los vasos sanguíneos están ausentes). Aquí ésta resulta útil como una referencia conveniente.





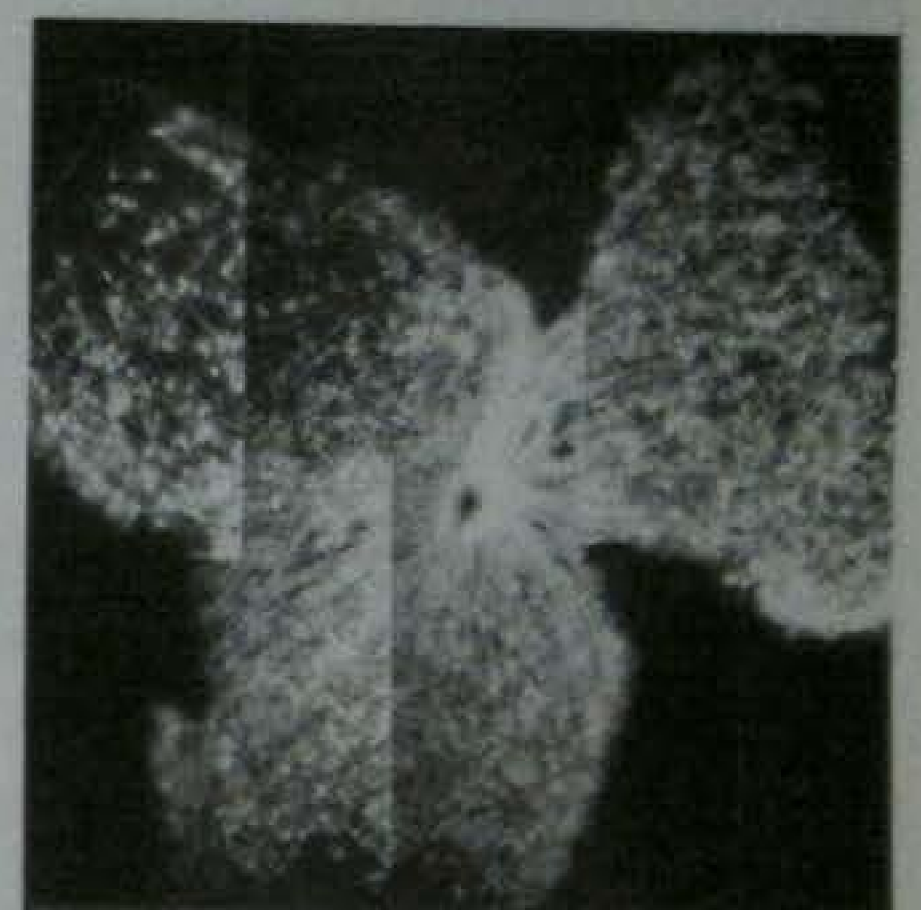


Fig. 22-18. Principales vías del sistema visual. A. En los mamíferos, el nervio óptico desde cada ojo se ramifica y envía fibras nerviosas al núcleo geniculado lateral a cada lado del cerebro. Sobre el lado homolateral, una parte específica de la retina proyecta hacia una parte específica del núcleo geniculado lateral. Sobre el lado contralateral, el núcleo geniculado lateral recibe aferencias desde todas partes de la retina. Las neuronas de cada núcleo geniculado lateral inervan la corteza visual sobre el mismo lado. B, C. Las retinas aisladas (y cortadas en trozos) de un embrión de ratón de 16 días muestran las proyecciones homolaterales (B) y contralaterales (C) desde las células ganglionares de la retina. El marcador carbocianina fluorescente DiI fue insertado detrás del quiasma óptico y se le permitió ingresar a los axones de la retina. El marcador se difunde a lo largo de los axones, localizándolos hasta sus orígenes. Las proyecciones homolaterales provienen en su mayoría desde una sola parte de la retina (en este caso, la región ventrotemporal). Las proyecciones contralaterales al mismo sitio provienen desde toda la superficie de la retina. (B, C de Colello y Guillery 1990; fotografías cortesía de los autores.)

aferencias desde cada ojo superponiéndose extensamente en la corteza visual (Hubel y Wiesel 1963; Crair y col. 1998). Sin embargo, cuando un ojo se cubre en la vida temprana del animal, sus conexiones en la corteza visual son sustituidas por las del otro ojo (fig. 22-19). Los axones compiten por estas conexiones y la experiencia juega un papel en el reforzamiento y la estabilización de las conexiones que son producidas. Por lo tanto, cuando se cosen cerrándose *ambos* ojos de un gatito por 3 meses, la mayor parte de las neuronas corticales todavía pueden ser estimuladas por la apropiada iluminación de un ojo o del otro. El tiempo crítico en el desarrollo del gatito para esta validación de las conexiones neuronales comienza entre las 4 y las 6 semanas después del nacimiento. La deprivación monocular hasta la cuarta semana produce muy poco o ningún déficit fisiológico, pero hasta la sexta semana, ésta produce todos los cambios neuronales característicos. Si un gatito ha tenido experiencia visual normal por los 3 primeros meses, cualquier deprivación monocular posterior (incluso por un año o más) no tiene efecto. En este punto, las sinapsis han sido estabilizadas.

Entonces, en el establecimiento del patrón del sistema visual de mamíferos pueden verse dos principios. En primer lugar, las conexiones neuronales involucradas en la visión están presentes aún antes que el animal vea. En segundo lugar, la experiencia juega un papel importante en la determinación de si persisten o no ciertas conexiones.* Así como la experiencia perfecciona las conexiones neuromusculares originales, la experiencia juega un papel en perfeccionar y mejorar las conexiones visuales. Es posible, además, que las funciones del adulto como el aprendizaje y la memoria se originen del establecimiento y/o del reforzamiento de diferentes sinapsis por la experiencia. Como Purves y Lichtman (1985) comentan:

> *La interacción de animales individuales y de su mundo continúa modelando el sistema nervioso durante la vida en modos que nunca podrían haber sido programados. La modificación del sistema ner-*

* Los estudios (Colman y col. 1997) han demostrado que las diferencias en la liberación de neurotransmisor resultan en cambios en la adhesividad sináptica y causan la retirada del axón que proporciona una estimulación débil. Los estudios en ratones (Huang y col. 1999; Katz 1999) sugieren que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es crucial durante el período crítico.

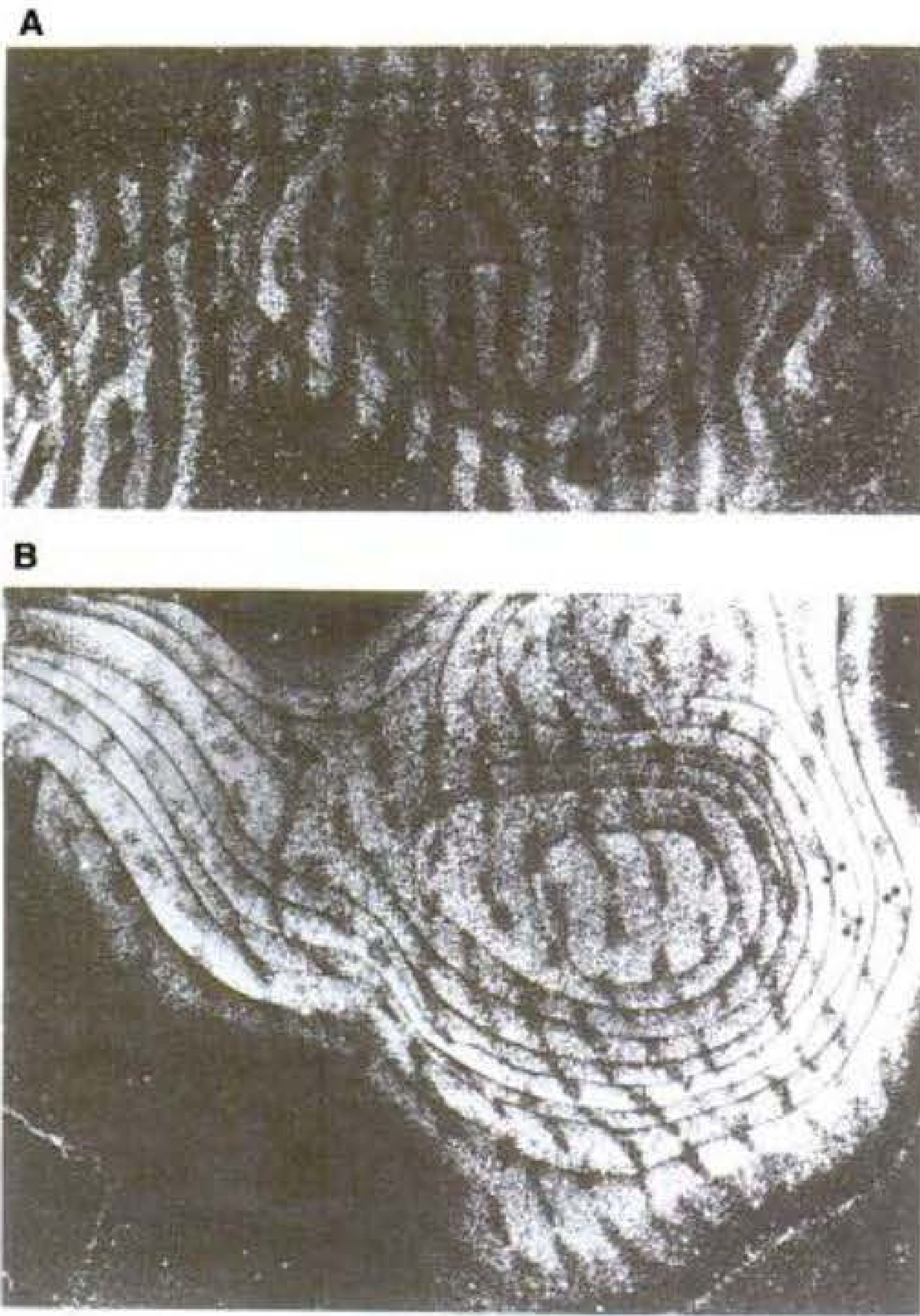
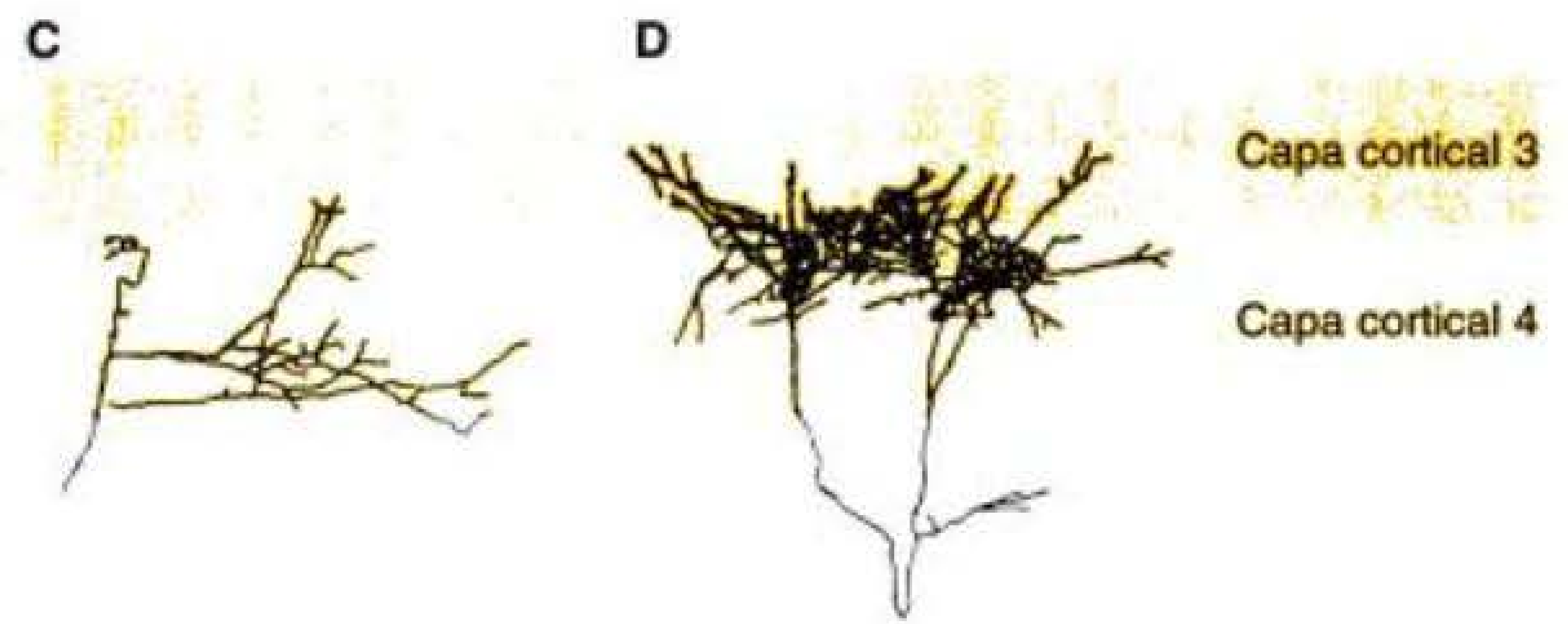


Fig. 22-19. A, B. Autorradiografías de campo oscuro de la corteza (visual) estriada del mono 2 semanas después de que un ojo fue inyectado con [^{3}H]prolina en el humor vítreo. Cada neurona retinal toma la marca radiactiva y la transfiere a las células con las que ésta forma sinapsis. A. Patrón de marcación normal. Las bandas blancas indican que casi la mitad de las columnas tomaron la marca, mientras que la otra mitad no lo hicieron; un patrón que refleja que la mitad de las células fueron inervadas por el ojo marcado y la mitad por el ojo no marcado. B. Patrón de marcación cuando el ojo sin marcar fue cerrado mediante sutura por 18 meses. Las proyecciones axonales desde el ojo normal (marcado) habían sustituido las regiones que normalmente deberían haber sido inervadas por el ojo suturado. C, D. Dibujos de los axones desde los núcleos geniculados laterales de gatitos en los que un ojo fue ocluido por 33 días. La ramificación terminal de los axones que recibe la aferencia desde el ojo ocluido (C) fue mucho más extensa que la de los axones que recibían la aferencia desde el ojo no ocluido (D). (A y B, de Wiesel 1982, fotografía cortesía de T. Wiesel; C y D, según Antonini y Stryker 1993.)



vioso por la experiencia es, por lo tanto, la última y más sutil estrategia del desarrollo.

SITIO WEB 22.9 **El fenómeno de la extremidad fantasma (The phantom limb phenomenon).** Los individuos que tienen una extremidad amputada a veces sienten dolor en su apéndice ausente. Este fenómeno parece ser causado por una reorganización de la corteza cerebral humana que sigue a la amputación.

Disruptores endocrinos

Si el desarrollo de un organismo es sensible a los factores ambientales, éste también es vulnerable a los agentes en el ambiente que pueden alterar el desarrollo normal. Los compuestos que pueden alterar el desarrollo normal se denominan **teratógenos**. Algunos de estos compuestos fueron mencionados en los capítulos 1 y 21. Una clase de teratógenos será discutida aquí: el grupo de compuestos denominados **disruptores endocrinos**, que son químicos exógenos que interfieren con la función normal de las hormonas.

Los disruptores endocrinos pueden alterar la función hormonal de muchos modos. Como se mencionó en el capítulo 21, pueden imitar los efectos de hormonas naturales (como en DES); pueden bloquear la síntesis de una hormona o bloquear la unión de una hormona a su receptor (como en finasteride); o pueden interferir en el transporte o eliminación de una hormona (como en PCB).

La toxicología del desarrollo y la disrupción endocrina son campos de investigación relativamente nuevos. Mientras que la toxicología tradicional ha buscado las causas ambientales de la muerte, del cáncer y de los daños genéticos, la investigación en disruptores endocrinos y el campo de la toxicología del desarrollo se centran sobre los papeles que los químicos ambientales pueden desempeñar en la alteración del desarrollo mediante la alteración de la función endocrina normal durante el desarrollo prenatal y posnatal (Bigsby y col. 1999).

SITIO WEB 22.10 **Disruptores endocrinos ambientales (Environmental endocrine disruptors).** La declaración del consenso de Wingspread de 1991 comenzó un movimiento por científicos para influir en la política del gobierno con respecto a potenciales disruptores endocrinos. Este sitio analiza esta declaración y algunas de las políticas que están siendo implantadas en la actualidad.

Estrógenos ambientales

Probablemente, no hay grandes polémicas en el campo de la toxicología sobre si los contaminantes químicos son responsables de malformaciones congénitas en animales salvajes, la disminución del recuento de espermatozoides en los hombres y el cáncer de mama en la mujer. Uno de los principales enfoques de esta investigación es si los contaminantes pesticidas pueden funcionar como estrógenos en mamíferos adultos y en desarrollo. El estrógeno es más que tan solo una "hormona sexual". En ambos sexos, los estrógenos son utilizados para regular el crecimiento muscular y esquelético, mantener la densidad ósea, el desarrollo de órganos del sistema inmune y ayudar a mantener el sistema nervioso. Por lo tanto, cual-

quier químico que activa o suprime a los receptores de estrógenos puede afectar potencialmente a varios órganos reproductores y no reproductores.

Hay varias fuentes de estrógenos ambientales. La primera fuente consiste de compuestos estrogénicos que se producen naturalmente. Además de los estrógenos que los embriones de mamíferos adquieren desde la sangre materna, los compuestos estrogénicos son también hallados en ciertas plantas (como la soja). Estos estrógenos derivados de las plantas son referidos como **fitoestrógenos**. La segunda fuente de compuestos estrogénicos son las drogas que son diseñadas específicamente para funcionar como estrógenos. Estas drogas incluyen a los estrógenos sintéticos utilizados en píldoras para el control de la natalidad (píldoras anticonceptivas) así como en drogas como el dietilestilbestrol (DES), que causa defectos congénitos en humanos cuando se administraron a mujeres embarazadas desde 1948-1971 (Hill 1997; Palanza y col. 2001; véase cap. 21). La tercera y la cuarta categoría son pesticidas y compuestos industriales. Éstos son vistos como fuentes significativamente incrementadas de estrógenos ambientales, debido a que los norteamericanos utilizan unos 2.000 millones de libras de pesticidas cada año y algunos residuos de pesticidas se mantienen en la cadena de alimentos por décadas. Además, los químicos industriales como los bifenilos policlorados (PCB), discutidos en el capítulo 21 y a continuación) y el bisfenol A (BPA, encontrado en las capas de plástico de los alimentos enlatados y en las pizzas de microondas) son ubicuos como resultado de nuestra cultura tecnológica

En 1962, Rachel Carson, una bióloga de la industria pesquera, publicó *Silent spring*, que se convirtió en uno de los libros más influyentes del siglo XX. Carson advirtió que los pesticidas estaban destruyendo la vida salvaje, que el DDT, en particular, parecía estar destruyendo las poblaciones de las aves costeras y que los pesticidas se estaban convirtiendo en un alimento básico de la dieta norteamericana. Por esta razón, fue injuriada por la industria química de la agricultura y considerada fanática, comunista y otros peores calificativos. Sin embargo, la investigación posterior confirmó su reclamo, y cuando se encontraron en peligro los halcones peregrinos y las águilas calvas debido a la fragilidad de las cáscaras de sus huevos inducida por el DDT (Cooke 1973); el uso de ese pesticida fue prohibido en los Estados Unidos.

Evidencia reciente ha demostrado que DDT (diclorodifenil-tricloroetano) y su principal producto metabólico, DDE (que carece de un átomo de cloro), pueden actuar como compuestos estrogénicos, por la imitación del estrógeno o por la inhibición de la efectividad de los andrógenos (Davis y col. 1993; Kelce y col. 1995). Aunque prohibido en los Estados Unidos en 1972, DDT tiene una vida media ambiental cercana a los 15 años. Esto significa que podría tomar 100 años o más para que algunas concentraciones de DDT en la tierra estén por debajo de los niveles activos. DDE es un estrógeno más potente que DDT y es capaz de inhibir la transcripción sensible a andrógenos en dosis comparables con las encontradas en la tierra contaminada en los Estados Unidos y en otros países. DDT y DDE han sido relacionados con problemas ambientales, como la disminución en la población de cocodrilos (alligators) en Florida, la feminización de peces en el Lago Superior, el aumento de los cánceres de mama y la disminución del recuento de espermatozoides en todo el mundo (Carlsen y col. 1992; Keiding y Skakkebaek 1993; Stone 1994; Swan y col. 1997). Guillette y col. (1994; Matter y col. 1998) han relacionado el vertido de contaminantes en el lago Apopka de la Florida (un vertido que incluye DDT, DDE y otros numerosos bifenilos policlorados) con hasta un 90% de la disminución en el porcentaje de nacimientos de cocodrilos y el reducido tamaño del pene en los machos jóvenes.

> SITIO WEB 22.11 **Rachel Carson y la prohibición del DDT (Rachel Carson and the ban on DDT).** Aún antes de la era de la biología molecular, Rachel Carson señaló que el DDT estaba teniendo efectos desastrosos sobre las poblaciones de aves. El DDT causó el adelgazamiento de las cáscaras de los huevos y las aves podían romper sus huevos cuando estaban sentadas sobre ellos. Su libro *Silent spring* causó el movimiento político que llevó a la prohibición del DDT en los Estados Unidos.

La **dioxina**, un producto del procesado químico utilizado para hacer pesticidas y productos de papel, ha sido relacionada con anomalías reproductoras en ratas macho. Los crías macho de ratas hembras expuestas a esta molécula lipofílica planar cuando estaban embarazadas han reducido el recuento de espermatozoides, tienen testículos pequeños y escasas conductas sexuales masculinas específicas. Los embriones de peces parecen particularmente susceptibles a la dioxina y a los compuestos relacionados, y se ha especulado que la cantidad de estos compuestos en los Grandes Lagos durante la década de 1940 fue tan alta que no sobrevivió ninguna de las truchas de lago eclosionadas allí durante ese tiempo (fig. 22-20; Hornung y col. 1996; Zabel y Peterson 1996; Johnson y col. 1998).

Los **bifenilos policlorados** (PCB) fueron ampliamente usados como refrigerantes antes de que fueran prohibidos en la década de 1970, cuando se demostró que causaban cáncer en las ratas. Sin embargo, todavía se mantienen circulando a través de la cadena alimentaria (en el agua y en los sedimentos) y han sido prohibidos por la generalizada declinación en las capacidades reproductoras de las nutrias, focas, visones y peces: un estrógeno ambiental, PCB, que se asemeja al dietilestilbestrol en la forma y que puede afectar al receptor de estrógeno como lo hace DES, quizás mediante la unión a otro sitio sobre el receptor de estrógeno.

Una molécula similar, el metoxicloro, es hallada en muchos pesticidas. Pickford y col. (1999) hallaron que el metoxicloro bloqueaba en *Xenopus* la maduración del ovocito inducida por progesterona a concentraciones semejantes a las halladas en el ambiente. Tal bloqueo debería inhibir severamente la fertilidad de las ranas y éste podría ser un componente de la declinación de las poblaciones de anfibios en todo el mundo.

Algunos científicos dicen que estas reivindicaciones son exageradas. Los estudios en ratones han demostrado que el tamaño de la camada, la concentración de los espermatozoides y el desarrollo no se vieron afectados por concentraciones ambientales de estrógenos relevantes ambientalmente. Sin embargo, un trabajo reciente de

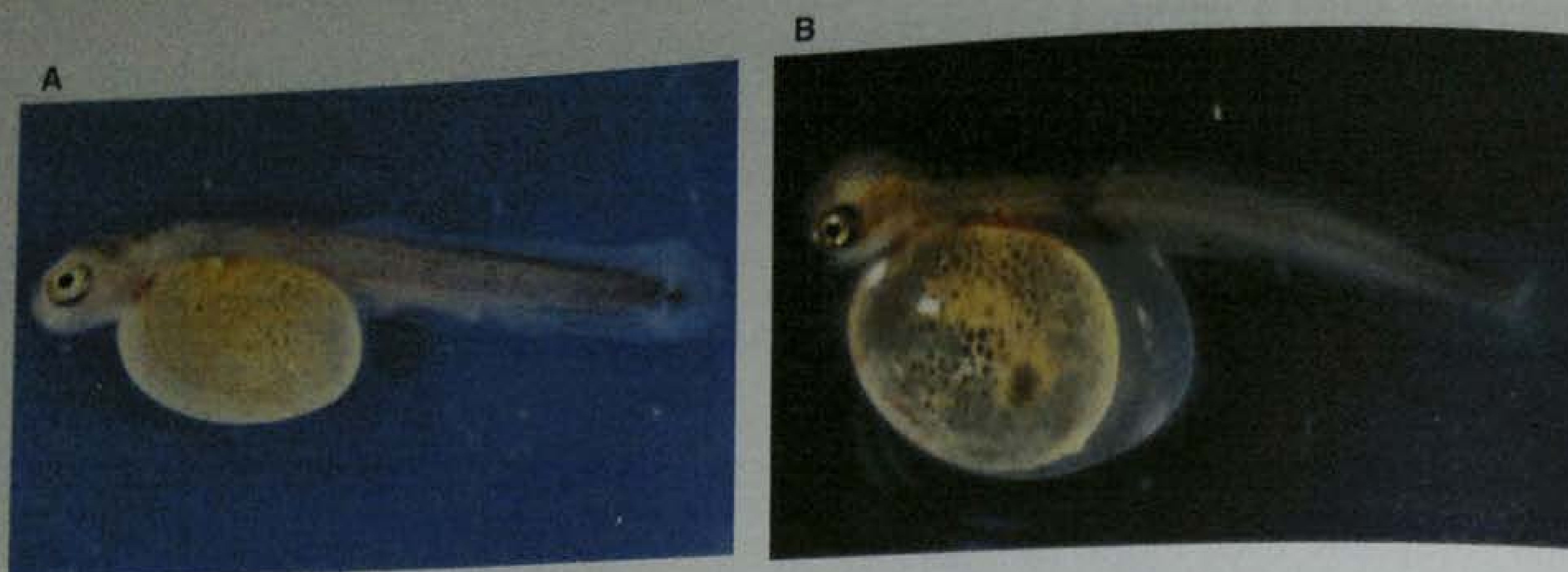


Fig. 22-20. Trucha de lago 4 semanas después de haber eclosionado. A. Larva normal con su saco de vitelo amarillo dorado. B. Larva expuesta a dioxina que exhibe un saco vitelino azul. El saco vitelino se ha hinchado con agua y tiene numerosos sitios de hemorragia. Tales peces a menudo tienen un crecimiento reducido, así como anomalías cardíacas y faciales. (Fotografía cortesía de R. E. Peterson.)

Spearow y col. (1999) ha demostrado una sorprendente diferencia genética en la sensibilidad a los estógenos entre las diferentes cepas de ratones. La cepa que habían utilizado para estudiar a los estrógenos ambientales, la cepa CD-1 es, al menos, 16 veces más resistente a la disrupción endocrina que las cepas más sensibles, como la B6. Cuando se implantaron bolitas que contenían estrógenos por debajo de la piel de ratones jóvenes CD-1 machos, sucedió muy poco. Sin embargo, cuando las mismas bolitas fueron colocadas por debajo de la piel de los ratones B6, sus análisis se redujeron y el número de espermatozoides observados en los túbulos seminíferos cayeron de manera espectacular (fig. 22-21). Este rango extenso de sensibilidades tiene consecuencias importantes para la determinación de los límites de seguridad para los seres humanos.

Otro factor involucrado en el establecimiento de los límites de seguridad es la interacción de los estrógenos

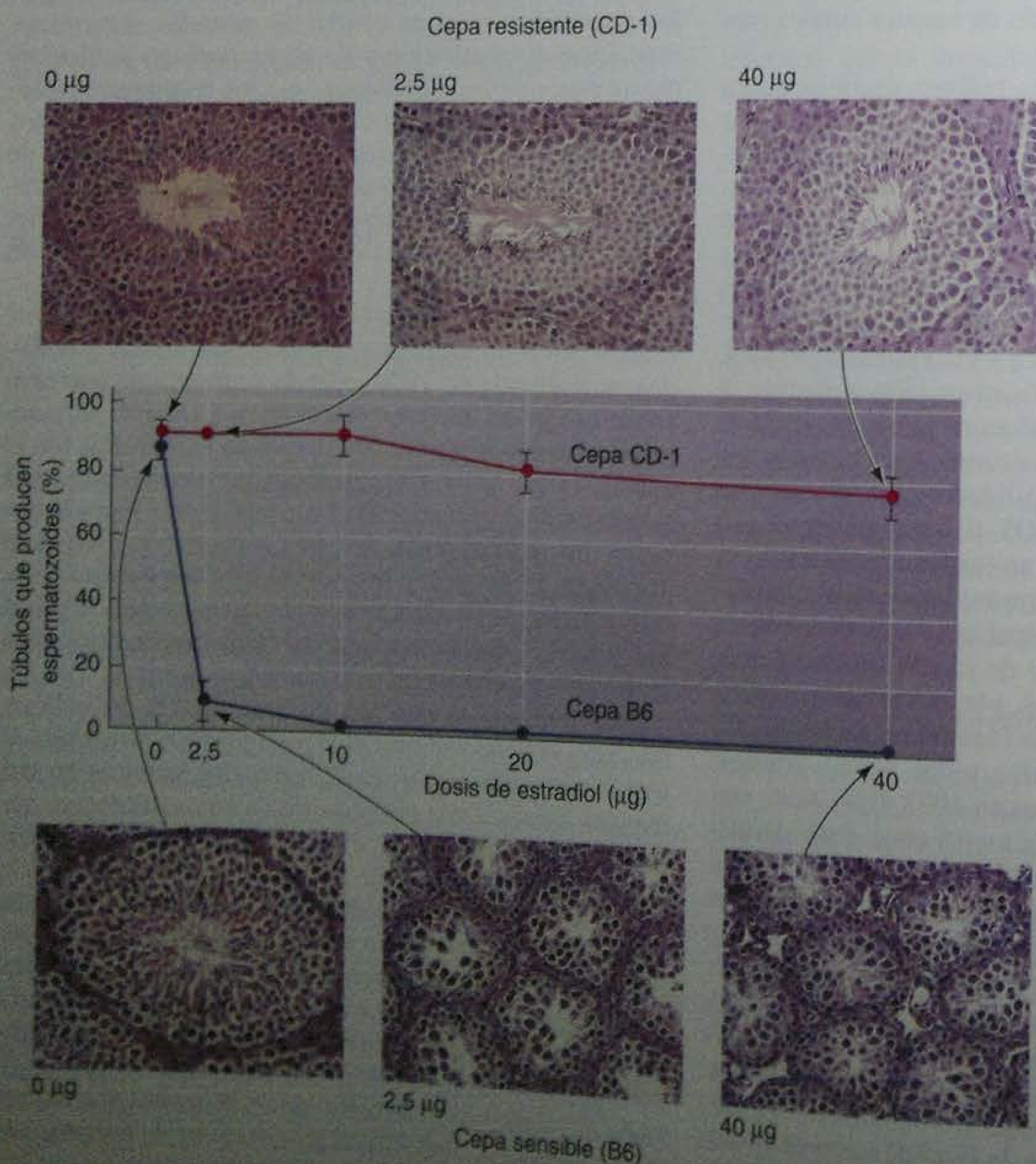


Fig. 22-21. Efectos de los implantes de estrógeno sobre diferentes cepas de ratones. El gráfico muestra el porcentaje de túbulos seminíferos que contienen espermatozoides alargados. (La media ± el error estándar es para un promedio de seis individuos). La fotografía muestra secciones tranversales de testículos y todos tienen el mismo aumento. 40 µg de estradiol no afectan la espermatogénesis en la cepa CD-1, pero tan poco como 2,5 µg de estradiol producen una abolición casi completa de la esperamatogénesis en la cepa B6. (Según Spearow y col. 1999; fotografías cortesía de J. L. Spearow.)

ambientales. Silva y col. (2002) han demostrado que si sus células son expuestas a una *mezcla* de estrógenos ambientales, cada una de las cuales tiene una concentración que induce muy débilmente a un gen sensible a estrógeno, esta mezcla puede inducir una respuesta que es mucho mayor que las respuestas sumadas de los componentes individuales (fig. 22-22).

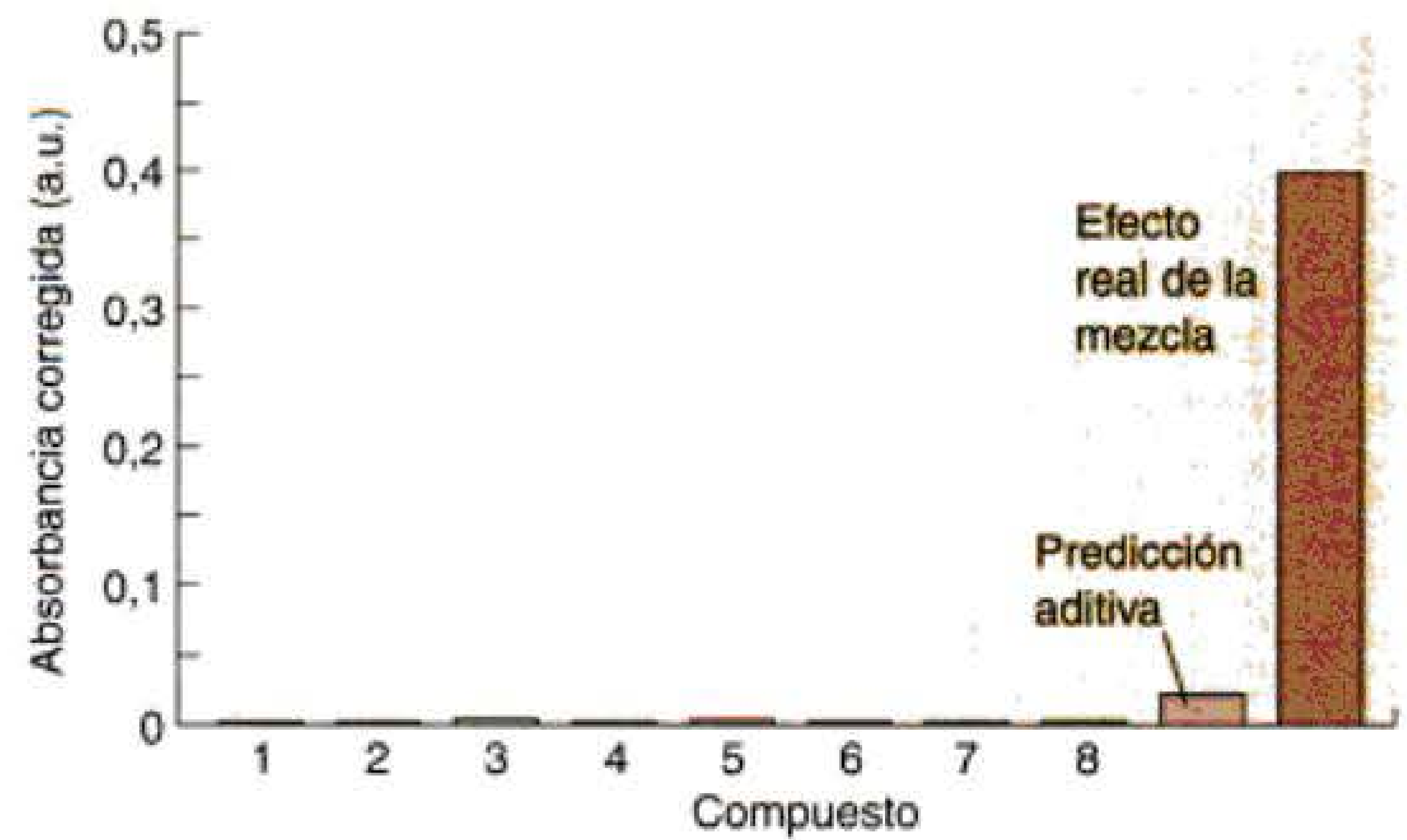


Fig. 22-22. Capacidad de una mezcla de compuestos estrogénicos para activar a bajas concentraciones a un gen que responde a estrógeno. Plásmidos que contienen un elemento de respuesta a estrógeno adheridos al gen *lacZ* fueron agregados a las células, y se agregaron cada uno de los ocho estrógenos ambientales a concentraciones que solo inducían débilmente la expresión del gen *lacZ*. Sin embargo, cuando una mezcla de estos ocho componentes fue agregada, la respuesta fue mucho mayor que los valores sumados de las respuestas separadas. (Según Silva y col. 2002.)

Disruptores ambientales de hormona tiroidea

Además de ser estrógenos ambientales, la estructura de algunos PCB se asemeja a la de las hormonas tiroideas (fig. 22-23) y la exposición a ellos altera los niveles séricos de hormona tiroidea humana. El PCB hidroxilado tiene alta afinidad por la proteína de transporte de hormona tiroidea sérica transtiretina y puede bloquear la unión de la tiroxina con esta proteína. Esto lleva a la elevada excreción de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas son críticas para el crecimiento de la cóclea del oído interno, y las ratas cuyas madres fueron expuestas a PCB tenían cócleas escasamente desarrolladas y defectos de audición (Goldey y Crofton, citado en Stone 1995; Cheek y col. 1999).

Cadenas de causalidad

Ya sea en la ley o en la ciencia, el establecimiento de las cadenas de causalidad es una exigencia y una tarea necesaria. En la toxicología del desarrollo, numerosos puntos finales deben ser verificados y se deben establecer muchos niveles de causalidad diferentes (Crain y Guillette 1998; McNabb y col. 1999). Por ejemplo, los investigadores podrían preguntarse si los vertidos contaminantes en el lago Apopka fueron responsables de las disminuciones de las poblaciones de cocodrilos (alligators). Para establecerlo, primero deberían preguntarse cómo los químicos específicos en el vertido podrían contribuir a anomalías fisiológicas en los cocodrilos (alligators) y cuáles serían las consecuencias de estas anomalías. El cuadro 22-3 muestra la cadena de causas postulada.

Después de observar que numerosos cocodrilos (alligators) en el lago Apopka habían declinado, las observaciones a *nivel poblacional* revelaron que había una disminución en el número de cocodrilos (alligators) que estaban naciendo (el ritmo de nacimiento). A *nivel de organismo*, los investigadores hallaron niveles inusualmente altos de estrógenos en las hembras de cocodrilos (alligators) e inusualmente bajos de testosterona en los machos. A *nivel de tejido y de órgano*, los investigadores observaron una elevada producción de estrógenos desde los testículos juveniles, malformaciones de los testículos y del pene, y cambios en la actividad enzimática en las gónadas de las hembras. A *nivel celular*, las anomalías del ovario fueron correlacionadas con niveles de estrógeno inusualmente elevados. Estos cambios celula-

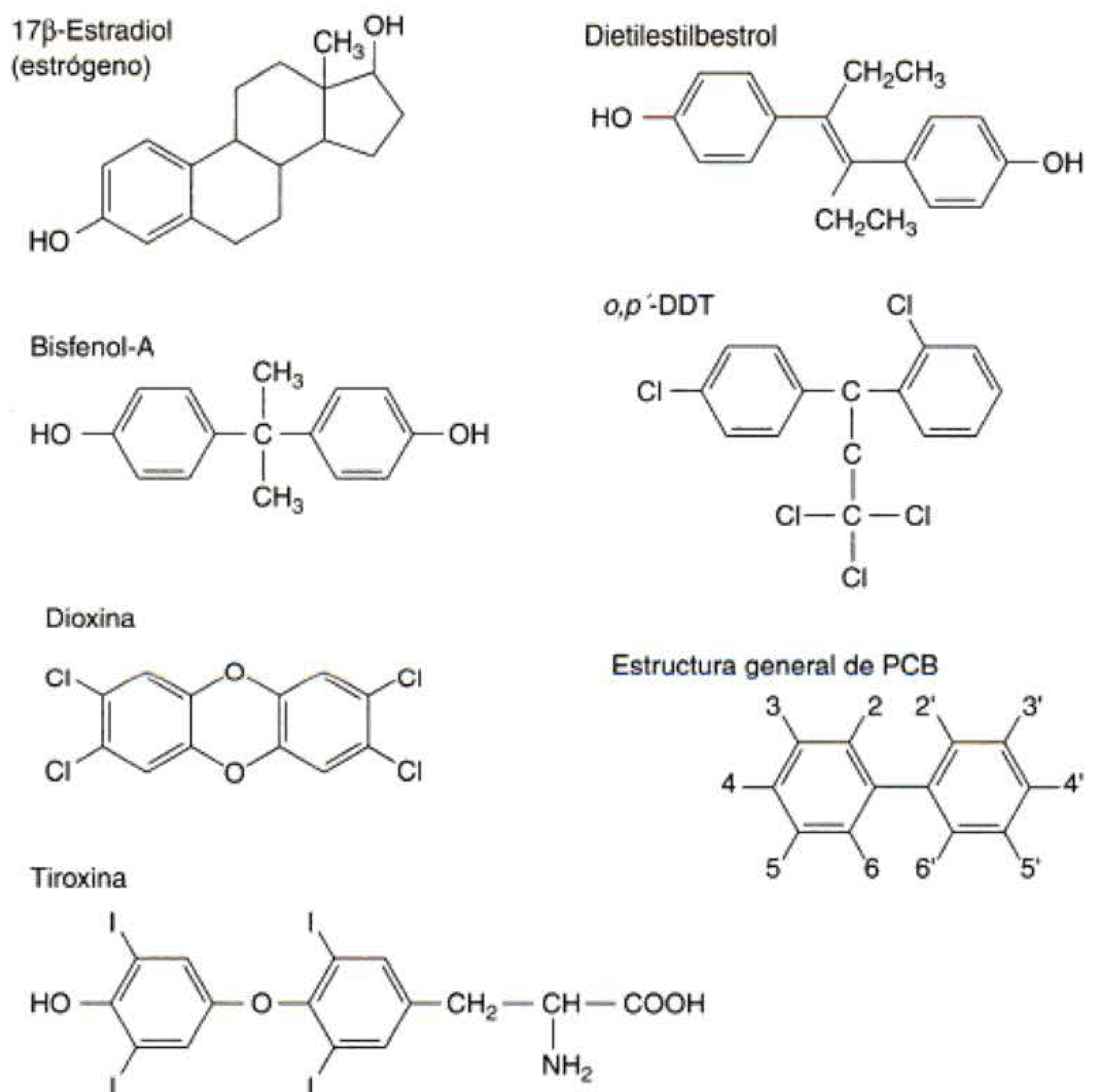


Fig. 22-23. Estructuras de algunas hormonas y disruptores endocrinos.

Cuadro 22-3 *Cadena de causalidades que relacionan los vertidos de contaminantes en el lago Apopka con la disrupción endocrina en los cocodrilos (alligators) juveniles*

Nivel	Evidencia
Población	La población de alligators juveniles en el lago Apopka ha disminuido
Organismo	Las hembras juveniles de Apopka tienen niveles circulantes elevados de 17β-estradiol
	Los machos juveniles de Apopka tienen concentraciones circulantes reducidas de testosterona
Tejido/Órgano	Las hembras juveniles de Apopka tienen alterada la actividad de la aromatasa gonadal
	Los machos juveniles de Apopka tienen túbulos seminíferos mal organizados
	Los machos juveniles de Apopka tienen un tamaño reducido del pene
	Los testículos de los machos juveniles de Apopka tienen una elevada producción de estradiol (estrógeno)
Celular	Las hembras juveniles de Apopka tienen folículos poliovulares que son característicos del exceso de estrógeno
Molecular	Muchos contaminantes se unen a los receptores de estrógenos y de progesterona de los alligator
	Muchos de estos contaminantes no se unen a las proteínas citosólicas del alligator que bloquean los excesos de hormonas

Fuente: Según Crain y Guillette 1998.

res pueden ser explicados a *nivel molecular* por el hecho de que muchos de estos químicos en los vertidos contaminantes se unen a los estrógenos del cocodrilo (alligator) y a los receptores de progesterona, y a que estos químicos son capaces de evitar las defensas usuales de la célula contra la sobreproducción de hormonas esteroideas (Crain y col. 1998). Por lo tanto, los contaminantes químicos pueden ser relacionados con una anomalía reproductora que puede explicar la disminución del ritmo de nacimiento entre los cocodrilos (alligators) en el lago.

La biología del desarrollo se encuentra con el mundo real

En una revisión reciente sobre el desarrollo de insectos, Fred Nijhout (1999) concluyó:

> *Un único genotipo puede producir múltiples fenotipos, según las muchas posibilidades con las que se encuentra durante el desarrollo. Esto es, el fenotipo es la consecuencia de unas series complejas de procesos del desarrollo que están influenciados por factores ambientales así como por los genes.*

El desarrollo frecuentemente se produce en un rico entorno ambiental, y la mayor parte de los animales es sensible a las señales ambientales. Como se vio en este capítulo, el ambiente puede determinar el fenotipo sexual, puede inducir adaptaciones estructurales y químicas sorprendentes en relación con las estaciones, puede inducir cambios morfológicos específicos que le permiten a un individuo huir de los depredadores y puede inducir la determinación de la casta en los insectos. El ambiente también puede alterar la estructura de nuestras neuronas y la especificidad de nuestras células inmunocompetentes. Lamentablemente, el ambiente también puede ser la fuente de químicos que alteran el proceso de desarrollo normal.

Este concepto por el cual el ambiente es crítico en la producción del fenotipo tiene muchas implicaciones. En primer lugar, la plasticidad del desarrollo del sistema nervioso asegura que cada persona es un individuo. Nuestro cerebro agrega experiencia al legado. Los temores que la clonación puede producir "miles de Hitlers", por ejemplo, son infundados. No solamente no han sido identificados genes para la intolerancia, la demagogia, la habilidad oratoria, o la astucia política, sino que para reconstruir a Hitler se debería tener su entorno personal, social y político para estar muy cercanos a replicar la personalidad del dictador. Wolpe (1997) ha señalado que pensar que un clon genéticamente idéntico de Hitler podría convertirse en un dictador intolerante es creer que esencialmente la misma genética ha hecho a Hitlter una persona nefasta. De modo semejante, Gould (1997) señaló que incluso Eng y Chang Bunker, los gemelos unidos muy bien publicitados que muy probablemente compartieron todos sus genes y que ciertamente compartieron su ambiente, se convirtieron en personas muy diferentes. Uno fue alegre y se abstuvo de todos los licores. El otro fue taciturno y alcohólico (lo que fue un problema, debido a que compartían el mismo hígado). La plasticidad del sistema nervioso nos permite ser individuales y "nos permite escapar a la tiranía de los genes" (Childs 1999). Como se mencionó en el capítulo 4, incluso la oveja clonada desde el mismo embrión (y por esta razón con el mismo genoma) puede ser muy diferente de la otra. Por lo tanto, se puede dar una respuesta definitiva a la pregunta planteada por Wolpert (p. 51) en 1994:

> *¿Podrá la célula huevo ser programable? ¿Esto es, dada una descripción total del ovocito fecundado –la secuencia total del DNA y la localización de todas las proteínas y del RNA– se podría predecir cómo se desarrollará el embrión?*

La respuesta tiene que ser, "No". No se puede reducir completamente el fenotipo a los genes heredados. La experiencia debe agregarse a la composición básica.

La idea de que el fenotipo es controlado en parte por otras especies (como en la simbiosis del desarrollo y en los polifenismos inducidos por depredadores) desde luego nos relaciona con nuestro ambiente. Nuestro "ser" es parcialmente construido por "otros", y el codesarrollo puede ser un concepto tan importante como el de coevolución. Debemos aprender a buscar señales del desarrollo que vienen no solo desde el interior del organismo, sino además desde el exterior. Nuestros métodos podrían tener que expandirse. Si los animales en la vida salvaje se desarrollan de modo diferente de como lo harían en nuestros laboratorios, podríamos tener que ir puertas afuera para estudiar los fenómenos del desarrollo; desde luego que no en los procedimientos de funcionamiento estándar de la investigación pasada. Relyea y Mills (2001) hallaron que, mientras que ciertos pesticidas fueron inofensivos para los renacuajos en el laboratorio, las mismas concentraciones del pesticida fueron mortales cuando los renacuajos experimentaron las respuestas inducidas de los depredadores.

Información adicional y especulaciones

Ranas deformes

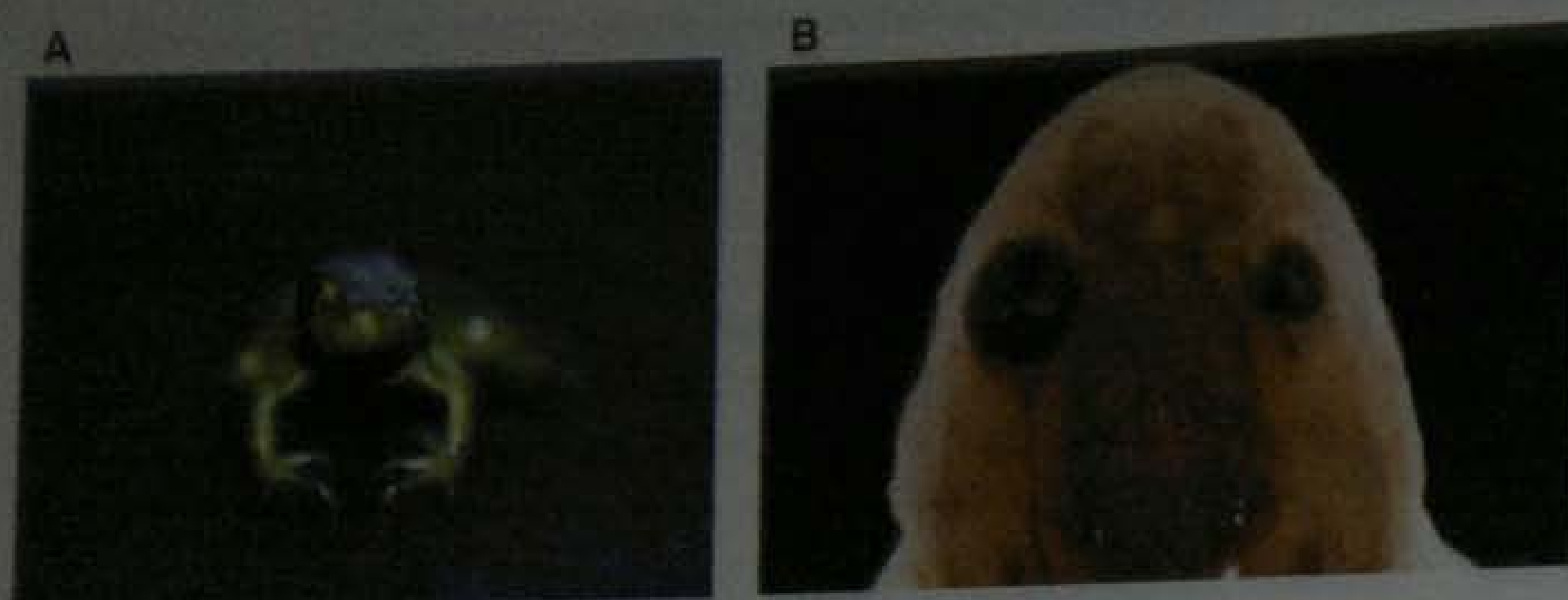
A lo largo de los Estados Unidos y del sur de Canadá, hay un incremento significativo en el número de ranas y salamandras deformes en las lagunas de los bosques que aparentan estar en un impecable estado. En algunas lagunas locales, se estima que el 60% de ciertas especies de anfibios tiene malformaciones visibles (fig. 22-24A; Ouellet y col. 1997; NARCAM 2002). Estas deformidades incluyen extremidades extras o ausentes, ojos ausentes o mal localizados, mandíbulas deformadas y corazón e intestino malformados. En los años recientes, parecen haber ganado aceptación tres de las hipótesis que han sido propuestas para explicar el fenómeno.

La primera hipótesis propone una combinación de causas. La causalidad próxima de la deformidad de la extremidad puede ser la infección del esbozo de la extremidad larval por los parásitos trematodos (Stopper y col. 2002; véase fig. 16-3). Bajo la mayor parte de las condiciones, las larvas de trematodos pueden ser destruidas por el sistema inmune del renacuajo. Sin embargo, en algunas lagunas, parece que los renacuajos han adquirido un síndrome de deficiencia inmune. Kiesecker (2002) ha demostrado que las ranas en hábitat contaminados por ciertos pesticidas son menos capaces de resistir a la infección por el parásito. Halló que ni los pesticidas solos ni los trematodos solos eran suficientes para provocar las deformidades de las extremidades en las poblaciones salvajes de las ranas, pero que la combinación de los dos factores daba como resultado que una significativa proporción de la población de la rana mostraba deformidades de las extremidades. Al menos en algunas especies, la infección con trematodos tiene que ser acoplada con contaminantes para que las anomalías de las extremidades puedan ser observadas. Los contaminantes pueden suprimir la resistencia inmune de los renacuajos hacia las larvas de los trematodos.

Pero algunos lagos que contienen altas proporciones de ranas malformadas no parecen estar infectadas con trematodos. Una segunda hipótesis propuesta fue que la radiación ultravioleta puede causar estas malformaciones. Ankley y col. (2002) han demostrado que mientras la radiación UV puede causar la muerte de los embriones de anfibio (véase cap. 3), los individuos que sobreviven tienen altas proporciones de deformidades de las extremidades. El espectro de anomalías de las extremidades visto en ranas que se desarrollan desde embriones y renacuajos expuestos a UV es de algún modo diferente al visto en las poblaciones naturales (Meteyer y col. 2000), pero esta explicación puede dar cuenta de algunas de las anomalías de las extremidades.

Hay otras malformaciones (no de las extremidades) que no parecen ser explicables por este camino. Sin embargo, y una tercera posibilidad es que los pesticidas tipo ácido retinoico estén causando disrupciones fisiológicas. El espectro de anomalías visto en las poblaciones naturales de las ranas deformes se asemeja al de las malformaciones causadas por la exposición de los renacuajos al ácido retinoico (Crawford y Vincenti 1998; Gardiner y Hoppe 1999), y Ndayibagira y col. (2002) han demostrado que el ácido retinoico puede inducir todas las malformaciones de las extremidades vistas en las poblaciones salvajes de algunas especies de ranas deformes. Además, Grün y col. (2002), en el mismo laboratorio, han purificado un retinoide disruptor endocrino desde el agua de un lago que tenía una alta incidencia de anfibios malformados.

Si los retinoides están en el agua, ¿cómo han llegado hasta allí? Ciertos herbicidas, como atrazina (Hayes y col. 2002, 2003; Tavera-Mendoza y col. 2002; véase fig. 17-24) se piensa que son responsables de las malformaciones gonadales en muchas especies de ranas y algunos científicos especulan que ciertos pesticidas aplicados en forma de pulverización para el control de mosquitos y de garrapatas podrían ser los responsables de las deformidades de las extremidades y del ojo (Hilleman 1996; Ouellet y col. 1997). Una posibilidad de la activación de la vía del ácido retinoico involucra al compuesto insecticida metopreno. El metopreno es un imitador de la hormona juvenil que inhibe a la pupa de mosquito a metamorfosear hacia adulto. Debido a que los vertebrados no tienen hormona juvenil, se asumió que este pesticida no debería dañar a los peces, anfibios o humanos. En efecto, éste ha sido el caso hallado: el metopreno, en sí mismo, no tiene propiedades teratogénicas. Sin embargo, en la exposición a la luz del sol, el metopreno se fragmenta en productos que tiene una significativa actividad teratogénica en ranas (fig. 22-24B,C). Estos compuestos tienen una estructura similar a la del ácido retinoico y se uni-



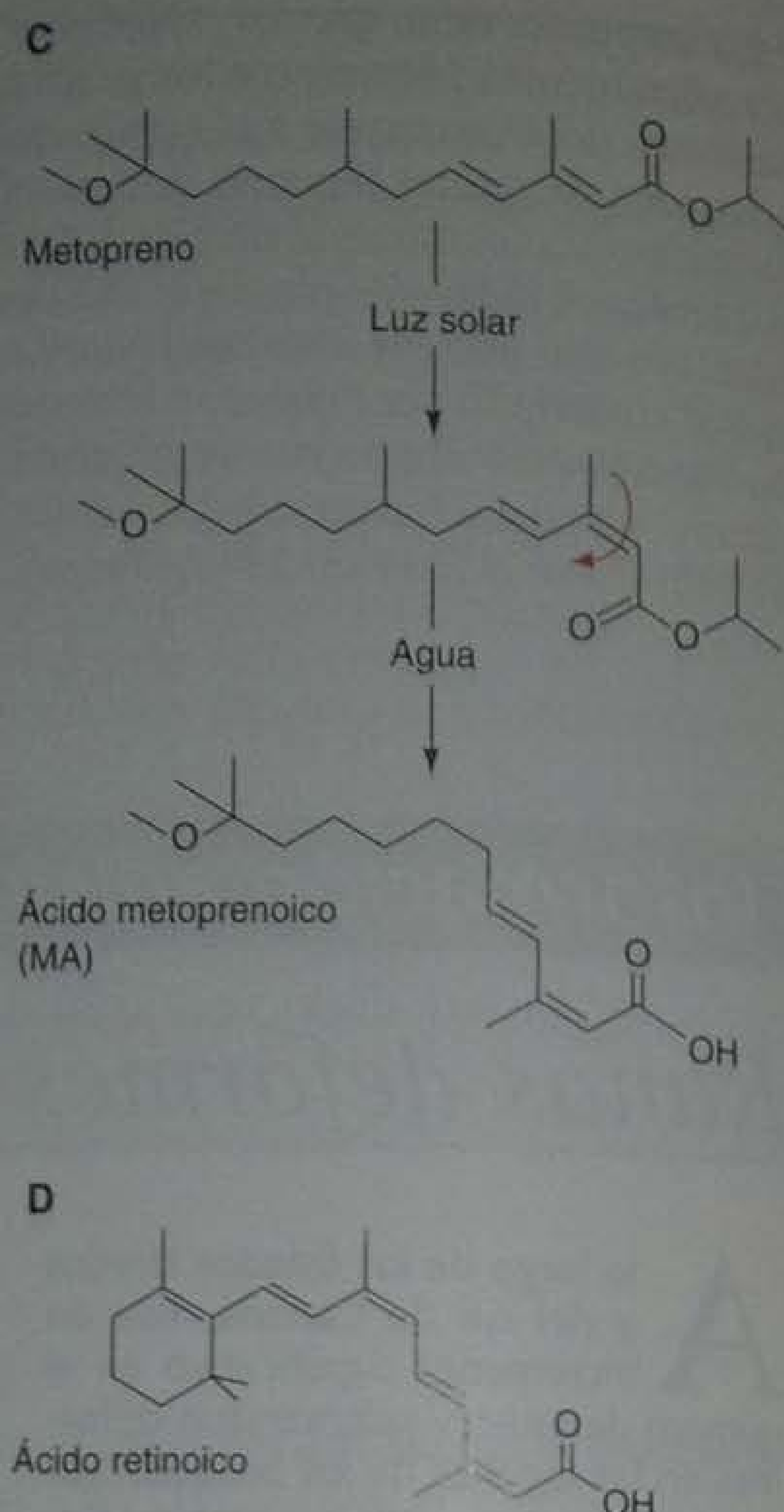


Fig. 22-24. Teratogénesis en ranas. **A.** Rana verde tipo salvaje (*Rana clamitans*) con una deformidad del ojo, recogida en New Hampshire en 1999 por K. Babbit. **B.** Renacuajo de *Xenopus* con una deformidad del ojo causada por la incubación de huevos recién fecundados (gametos femeninos recién fecundados) en aguas que contenían ácido metoprénico o por productos del metopreno. **C.** Uno de varios caminos por los cuales el metopreno puede descomponerse en compuestos teratogénicos, como ácido metoprénico. **D.** Un isómero del ácido retinoico que muestra semejanzas estructurales con el ácido metoprénico. (A, fotografía cortesía de K. Babbit y K. Reed; B, fotografía cortesía de J. Bantle; C, D, según La Claire y col. 1998.)

rán al receptor de retinoide (Harmon y col. 1995; La Claire y col. 1998). Cuando los huevos de *Xenopus* fueron incubados en agua que contenía estos compuestos, los renacuajos eran frecuentemente malformados y mostraban un espectro de deformidades similar al visto en el salvaje (La Claire y col. 1998).

SITIO WEB 22.12 **Ranas y salamandras deformes (Deformed frogs and salamanders).** Las observaciones originales de ranas malformadas fueron hechas por las clases de ciencia de la escuela pública de Minnesota. Desde entonces, se ha hecho un considerable esfuerzo para encontrar las causas de la reciente declinación de las poblaciones de anfibios y de las anomalías del desarrollo que están siendo descubiertas en estos organismos. Hay varios sitios web para registrar y analizar las malformaciones de los anfibios.

En efecto, los acontecimientos recientes pueden hacer necesario el reclutamiento de la biología del desarrollo al servicio de la biología de la conservación, un campo donde ésta no ha sido activa. Los estudios sobre pesticidas de Hayes, Relyea y Mills, LeClaire y otros indican que los químicos antropogénicos pueden causar la disminución de las poblaciones naturales al matar a los embriones o a los fetos, o por hacer inútiles a los adultos incapaces de aparearse. Los estudios de Morreale y col. (1982) demostraron que las prácticas de la biología de la conservación deben incorporar la comprensión del camino del desarrollo que funciona en la vida salvaje.

El estudio de la regulación ambiental del desarrollo también abre todo un nuevo mundo para los biólogos del desarrollo. Los ecologistas conocen numerosas historias de la plasticidad del desarrollo: animales que obtienen diferentes morfologías de la mandíbula con diferentes dietas (Corruccini y Beecher 1982; Stearns 1989; Hegrenes 2001); animales que reabsorben órganos en ciertas condiciones (Piersma y Gill 1998) y ranas que pueden cambiar su desarrollo en minutos ante la presencia de un depredador (Warkentin 1995, 2000). La causalidad próxima de estos increíbles cambios de desarrollo no ha sido estudiada.

Al regresar al "mundo real", los biólogos del desarrollo están haciendo la ciencia que integra ecología, evolución, genética, biología celular, y fisiología. En 1973, el biólogo evolutivo Leigh Van Valen afirmó que la evolución puede ser definida como "el control del desarrollo por la ecología". Se ha alcanzado un punto donde se pueden comenzar a estudiar los mecanismos por los cuales esto sucede.

Resumen: regulación ambiental del desarrollo

1. El desarrollo a veces es señalizado sobre las circunstancias normales que el organismo puede esperar encontrar en su ambiente. Las larvas de muchas especies marinas no comienzan la metamorfosis hasta que encuentran un sustrato adecuado. En otros ejemplos, las relaciones simbióticas entre dos o más especies son necesarias para el desarrollo completo de una o más de estas especies.
2. La plasticidad del desarrollo de acuerdo con las circunstancias ambientales hace posibles diferentes fenotipos desde el mismo genotipo.
3. Algunas especies exhiben polifenismos, en las que fenotipos claramente diferentes son provocados por diferentes señales ambientales. Muchas especies tienen una norma de reacción extensa, por la cual el genotipo puede responder de un modo graduado a las condiciones ambientales.
4. Las señales estacionales, como el fotoperíodo, la temperatura o el tipo de alimento pueden alterar el desarrollo en modos que hacen al organismo más apropiado bajo las condiciones en las que se encuentra. Los cambios en la temperatura también son responsables de la determinación del sexo en varios organismos, incluyendo a muchos reptiles y peces.
5. Los polifenismos inducidos por depredadores han evolucionado de modo tal que las especies que constituyen la presa pueden responder morfológicamente a la presencia de un depredador específico. En algunos ejemplos, esta adaptación inducida puede ser transmitida a la progenie de la presa.
6. La diferenciación de las células inmunocompetentes y la formación de las sinapsis en el sistema visual son ejemplos de experiencia que influye sobre el fenotipo.
7. Numerosos compuestos presentes en el ambiente pueden actuar como hormonas que imitan o antagonizan. Estos compuestos pueden alterar el desarrollo normal al interferir en el sistema endocrino.
8. Las diferencias genéticas pueden predisponer a los individuos a ser afectados de modo diferente por los teratógenos.

Bibliografía citada

Abouheif, E. and G. A. Wray. 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. Science 297: 249-252.

Adler, F. R. and C. D. Harvell. 1990. Inducible defenses, phenotypic variability, and biotic environments. Trends Ecol. Evol. 5: 407-410.

F Agrawal, A. A., C. Laforsch and R. Tollrian. 1999. Transgenerational induction of defenses in animals and plants. Nature 401: 60-63.

Alvarez-Buylla, A., J. R. Kirn and F. Nottebohm. 1990. Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. Science 249: 1444-1446.

Ankley, G. T., S. A. Diamond, J. E. Tietge, G. W. Holcombe, K. M. Tensen, D. L. Defoe and R. Peterson. 2002. Assessment of risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformations in the northern leopard frog (Rana pipiens). Environ. Sci. Technol. 36: 2853-2858.

Antonini, A. and M. P. Stryker. 1993. Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. Science 260: 1818-1821.

Bachmann, M. D., R. G. Carlton, J. M. Burkholder and R. G. Wetzel. 1986. Symbiosis between salamander eggs and green algae: Microelectrode measurements inside eggs demonstrate effects of photosynthesis on oxygen concentrations. Can. Zool. 64: 1586-1588.

Bard, J. B. L. 1990. Traction and the formation of mesenchymal condensations in vivo. BioEssays 12: 389-395.

Baxter, G. T. and D. E. Morse. 1992. Cilia from abalone larvae contain a receptor-dependent G-protein transduction system similar to that in mammals. Biol. Bull. 183: 147-154.

Beck, S. D. 1980. Insect Photoperiodism, 2nd Ed. Academic Press, New York.

Bigsby, R. and 8 others. 1999. Evaluating the effects of endocrine disrupters on endocrine function during development. Environ. Health Perspect. [Suppl.] 107: 613-618.

Black, J. E., K. R. Issacs, B. J. Anderson, A. A. Alcantara and W. T. Greenough. 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5568-5572.

Blaustein, A. and L. K. Beldin. 2003. Amphibian defense against W-B radiation. Evol. Dev. In press.

Bolker, J. A. 1995. Model systems in developmental biology. BioEssays 17: 451-455.

Borovsk, D., D. A. Carlson, P. R. Griffin, J. Shabanowitz and D. F. Hunt. 1990. Mosquito oostatic factor: A novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. FASEB J. 4: 3015-3020.

Brakefield, P. M. and N. Reitsma. 1991. Phenotypic plasticity, seasonal climate, and the population biology of Bicyclus butterflies (Satyridae) in Malawi. Ecol. Entomol. 16: 291-303.

Brakefield, P. M. and 7 others. 1996. Development, plasticity, and evolution of butterfly eye-spot patterns. Nature 384: 236-242.

Brian, M. V. 1974. Caste differentiation in Myrmica rubra: The role of hormones. J. Insect Physiol. 20: 1351-1365.

Brian, M. V. 1980. Social control over sex and caste in bees, wasps and ants. Biol. Rev. 55: 379-415.

Brönmark, C. and L. Pettersson. 1994. Chemical cues from piscivores induce a change in morphology in crucian carp. Oikos 70: 396-402.

Brunetti, C. R., J. E. Selegue, A. Monteiro, V. French, P. M. Brakefield and S. B.

Carroll. 2001. The generation and diversification of butterfly eyespot color patterns. Curr. Biol. 11: 1578-1585.

Bry, L., P. G. Falk and J. L. Gordon. 1996. Genetic engineering of carbohydrate biosynthetic pathways in transgenic mice demonstrates cell qcle-associated regulation of glycoconjugate production in small intestinal epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1161-1166.

Burnett, F. M. 1959. The Clonal Selection Theory of Immunity. Vanderbilt University Press, Nashville.

Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding and N. E. Skakkebaek. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit. Med. J. 305: 609-613.

Carson, R. 1962. Silent Spring. Houghton-Mifflin, New York.

Cebra, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am. J. Clin. Nutr. 69 (Supplement). 1046S-1051S.

Charnov, E. L. and J. J. Bull. 1977. When is sex environmentally determined? Nature 266: 828-830.

Cheek, A. O., K. Kow, J. Chen and J. A. McLachlan. 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. Environ. Health Perspect. 107: 273-278.

Childs, B. 1999. Genetic Medicine: A Logic of Disease. John Hopkins University Press.

Cohen, C. S. and R. R. Strathmann. 1996. Embryos at the edge of tolerance: Effects of environment and structure of egg masses on supply of oxygen to embryos. Biol. Bull. 190: 8-15.

Colello, R. J. and R. W. Guillery. 1990. The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: Retinal position and axon course. Development 108: 515-523.

Colman, H., J. Nabekura and J. W. Lichtman. 1997. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. Science 275: 356-361.

Conover, D. O. and S. W. Heins. 1987. Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. Nature 326: 496-498.

Cooke, A. S. 1973. Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. Environ. Pollut. 4: 85-152.

Corruccini, R. S. and C. L. Beecher. 1982. Occlusal variation related to soft diet in a nonhuman primate. Science 218: 74-76.

Crain, D. A. and L. L. Guillette, Jr. 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. Anim. Reprod. Sci. 53: 77-86.

Crain, D. A., N. Noriega, P. M. Vonier, S. F. Arnold, J. A. McLachlan and L. J. Guillette Jr. 1998. Cellular bioavailability of natural hormones and environmental contaminants as function of serum and cytosolic binding factors. Toxicol. Ind. Health 14: 261-273.

Crair, M. C., D. C. Gillespie and M. P. Stryker 1998. The role of visual experience in the development of columns in the cat visual cortex. Science 279: 566-570.

Crawford, K. and D. M. Vincenti. 1998. Retinoic acid and thyroid hormone may function through similar and competitive pathways in regenerating axolotls. J. Exp. Zool. 282: 724-738.

Davis, D. L., H. L. Bradlow, M. Wolff T. Woodruff, D. G. Hoel and H. Anton-Cuiver. 1993. Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. Environ. Health Perspect. 101: 372-377.

Dedeinde, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg and Boulétreau. 2001. Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6247-6252.

Degnan, B. M. and D. E. Morse. 1995. Developmental and morphogenetic gene regulation in Haliotis rufescens larvae at metamorphosis. Am. Zool. 35: 391-398.

Denno, R. F., L. W. Douglass and D. Jacobs. 1985. Crowding and host plant nutrition: Environmental determinants of wing form in Prokelisia marginata. Ecology 66: 1588-1596.

Denver, R. J. 1999. Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. Neuropeptides: Structure and Function in Biology and Behavior. Ann. N.Y. Acad. Sci. 897: 46-53.

Denver, R. J., N. Mirhadi and M. Phillips. 1998. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: Response of Scaphiopus hammondii tadpoles to habitat desiccation. Ecology 79: 1859-1872.

Dodson, S. 1989. Predator-induced reaction norms. BioScience 39: 447-452.

Evans, J. D. and D. E. Wheeler. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, Apis mellifera. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 5575-5580.

Evans, J. D. and D. E. Wheeler. 2001. Expression profiles during honeybee caste determination. Genom. Biol. 2: 1001.1-1001.6.

Fallon, A. M., H. H. Hagedorn, G. R. Wyatt and H. Laufer. 1974. Activation of vitellogenin syntesis in the mosquito Aedes aegypti by ecdysone. J. Insect Physiol. 26: 829-1823.

Ferguson, M. W. J. and T. Joanen. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. Nature 296: 850-853.

Gardiner, D. M. and D. M. Hoppe. 1999. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (Rana septentrionalis). J. Exp. Zool. 284: 207-216.

Gilbert, S. F. 1994. Dobzhansky, Waddington, and Schmalhausen: Embryology and the Modern Synthesis. In M. B. Adams (ed.), The Evolution of Theodosius Dobzhansky: Essays on His Life and Thought in Russia and America. Princeton University Press, Princeton, pp. 143-154.

Gilbert, S. F. 2001. Ecological developmental biology: Developmental biology meets the real world. Dev. Biol. 233: 1-12.

Gil-Turnes, M. S., M. E. Hay and W. Fenical. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. Science 246: 116-118.

Godwin, J., R. Sawby, R. R. Warner, D: Crews and M. S. Grober. 2000. Hypothalamic arginine vasotocin mRNA abundance variation across sexes and with sex change in a coral reef fish. Brain Behav. Evol. 55: 77-84.

Godwin, J., J. A. Luckenbach and R. J. Borski. 2003. Ecology meets endocrinology: Environmental sex determination in fishes. Evol. Dev 5: 40-49.

Gotthard, K. and S. Nylin. 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: A selective review of plasticity in animal morphology and life history. Oikos 74: 3-17.

Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves and T. J. Shors. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nature Neurosci. 2: 260-265.

Gould, S. J. 1997. Individuality. Sciences 37: 14-16.

Grober, M. S. and T. Sunobe. 1996. Serial adult sex change involves rapid and reversible changes in forebrain neurochemistry. Neuroreport 7: 2945-2949.

Grun, F., A. Ndayibagira, D. Gardiner, D. Hoppe and B. Blumberg.2002. HPLC purification of an Hill, M. endocrine disrupting retinoid activity from a Pollution Minnesota lake with a high incidence of mal- bridge. formed amphibians. Gordon Conference on Environmental Endocrine Disruptors, p. 1. Quoted with permission.

Guillette, L. J., T. S. Gross, G. R. Masson, J. M. Matter, H. F. Percival and A. R. Woodward. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspecdt,. 102: 680-688.

Hadfield, M. G.1977. Metamorphosis in marine molluscan larvae: An analysis of stimulus and response. In R.-S. Chia and M. E. Rice (eds.), Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae. Elsevier, New York, pp. 165-175.

Hagedorn, H. 1983. The role of ecdysteroids in the adult insect. In G. Downer and H. Laufer (eds.), Endocrinology of Insects. Alan R. Liss, New York, pp. 241-304.

Hardie, J. 1981. Juvenile hormone and photoperiodically controlled polymorphism in Aphis fabae: Postnatal effects on presumptive gynoparae. J. Insect Physiol. 27: 347-355.

Hardie, J. and A. D. Lees. 1985. Endocrine control of polymorphism and polyphenism. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol. 8. Pergamon Press, Oxford, pp. 441-490.

Harmon, M. A., M. F. Boehm, R. A. Heyman and D. J. Mangelsdorf. 1995. Activation of mammalian retinoid-X receptors by the insect growth regulator methoprene. Proc. Natl. Acad Sci. USA 92: 6157-6160.

Hart, M. W. and R. R. Strathmann. 1994. Functional consequences of phenotypic plasticity in echinoid larvae. Biol. Bull. 186: 291-299.

Hanell, C. W. 1986. The ecology and evolution of inducible defences in a marine bryozoan: Cues, costs, and consequences. Am. Nat. 128: 810-823.

Harvell, C. W. 1999. Complex biotic environments: Coloniality and the hereditary variation for inducible defences. In R. Tollrian and C. D. Harvell (eds.), The Ecology and Evolution of Inducihle Defenses. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 231-244

Hayes, T. B., A. Collins, M. Lee, M. Mendoza, N. Noriega, A. A. Stuart and A. Vonk. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5476-5480.

Hayes, T. B., K. Haston, M. Tsui, A. Hoag, C. Haeffele and A. Vonk. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0,1 ppb in Americal leopard frogs (Rana pipiens): Laboratory and field evidence. Environ. Health Res. Doi: 10.1289/ehp. 59232. In press.

Hegrenes, S. 2001. Diet-induced phenotypic plasticity of feeding morphology in the orange-spotted sunfish, Lepomis humilis. Ecol. Freshw. Fish, 35-42.

Hill, M. 1997. Understanding Environmental. Cambride University Press. Cambridge.

Hilleman, B. 1996. Frog deformities pose a mystery. Chem. Engnr. News 74: 24.

Hoffmann, R. J. 1973. Environmental control of seasonal variation in the butterfly Colias eurytheme. I. Adaptive aspects of a photoperiodic response. Evolution 27: 387-397.

Hooper, L. V., L. Bry, P. G. Falk and J. I. Gordon. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: Exploring an internal ecosystem. BioEssays 20: 336-343.

Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk and J. I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relation-ships in the intestine. Science 291: 881-884.

Hornung, M. W., E. W. Zabel and R E. Peterson. 1996. Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality. Toxicol. Appl. Pharmacol. 140: 227-234.

Huang, Z and 7 others. 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. Cell 98: 739-755.

Hubel, D. H. 1967. Effects of distortion of sensory input on the visual system of kittens. Physiologist 10: 17-45.

Hubel, D. H. and T. N. Wiesel. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. J. Physiol. 160: 106-154.

Hubel, D. H. and T. N. Wiesel. 1963. Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. J. Neurophysiol. 26: 944-1002.

Ikegame, M., O. Ishibashi, T. Yoshizawa, J. Shimomura, T. Komori, H. Ozawa, and H. Kawashima. 2001. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. J. Bone Miner. Res. 16: 24-32.

Janzen, F. J. and G. L. Paukstis. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. Q. Rev. Biol. 66: 149-179.

Johnson, R. D. and 10 others. 1998. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to early life stage brook trout (Salvelinusfontinalis) following parental dietary exposure. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2408-2421.

Katz, L. C. 1999. What's critical for the critical period in the visual cortex? Cell 99: 673-676.

Keiding, N and N. E. Skakkebaek. 1993. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 341: 1392-1395.

Kelce, W. R., C. R. Stone, S. C. Laws, L. E. Gray, J. A. Kemppainen and E. M. Wilson. 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature 375: 581-585.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage. 1997a. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386: 493-495.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage.1997b. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proc Natl. Acad. Sci. USA 94: 10409-10414.

Kennedy, C., S. Suda, C. B. Smith, M. Miyaoka, M. Ito and L. Sokoloff. 1981. Changes in protein synthesis underlying functional plasticity in immature monkey visual system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3950-3953.

Kiesecker, J. M.2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? Prog. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9900-9904.

Koch, P. B. and D. Buckmann. 1987. Hormonal control of seasonal morphs by the timing of ecdysteroid release in Arachnia levana L. (Nymphalidae: Lepidoptera). J. Insect Physiol. 33: 823-929.

Koch, P. B., P. M. Brakefield and F. Kesbeke. 1996. Ecdysteroids control eyespot size and wing color pattern in the polyphenic butterfly Bicydus anynana (Lepidoptera: Satyridae). J. Insect Physiol. 42: 223-230.

La Claire, I. J., J. A. Bantle and J. Dumont. 1998. Photoproducts and metabolites of a common insect growth regulator produce devdopmental deformities in Xenopus. Environ. Sci. Technol. 32: 1453-1461.

Matter, J. M. and 8 others. 1998. Effects of endocrine-disrupting contaminants in reptiles: Alligators. In R. J. Kendall, R. L. Dickerson, J. P. Geisy and W. A. Suk (eds.), Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruptions in Wildlife. SETAC Press, Pensacola, FL, pp. 267-289.

McCollum, S. A. and J. Van Buskirk. 1996. Costs and benefits of a predator induced polyphenism in the gray treefrog Hyla chrysoscelis. Evolution 50: 583-593.

McFall-Ngai, M. J. 2002. Unseen forces: The influence of bacteria on animal development. Dev. Biol. 242: 1-14.

McFall-Ngai, M. J. and E. G. Ruby. 1991. Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. Science 254: 1491-1494.

McNabb, A. and 7 others. 1999. Basic physiology. In R. T. Di Giulio and D. E. Tillitt (eds.), Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates. SETAC Press, Pensacola, FL, pp. 113-223.

Meteyer, C. U. and 9 others. 2000. Hind limb malformations in free-living northern leopard rogs (Rana pipiens) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. Teratology 62: 151-171.

Montgomery, M. K. and M. J. McFall-Ngai. 1995. The inductive role of bacterial symbionts in the morphogenesis of a squid light organ. Am. Zool. 35: 372-380.

Morgan, T. H. 1909. Sex determination and parthenogenesis in phylloxerans and aphids. Science 29: 234-237.

Morreale, S. J., G. J. Ruiz, J. R. Spotila and E. A. Standora.1982. Temperature-dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. Science 216: 1245-1247.

Morse, A. N. C., C. A. Froyd and D. E. Morse. 1984. Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc Haliotis rufescens. Mar. Biol. 81: 293-298.

Müller, G. B. 2003. Embryonic motility: Environmental influences on evolutionary innovation. Evo. De 5: 56-60.

Müller, G. B. and J. Steicher. 1989. Ontogeny of the syndesmosis tibiofibularis and the evolution of the bird hindlimb: A caenogenetic feature triggers phenotypic novelty. Anat. Embryol. 179: 327-339.

NARCAM. 2002. North American Reporting Center for Amphibian Malformations. Northern Prairie Wildlife Research Center, James-town, ND. http://www.nprwc.usgs.gov/narcam.

Ndayibagira, A., F. Grun, B. Blumberg and D. M. Gardiner. 2002. Retinoids induce all the limb malformations observed in wild populations of deformed frogs. Gordon Conference on Environmental Endocrine Disruptors. P. I Quoted with permission.

Newman, R. A. 1989. Developmental plasticity of Scaphiopus couchii tadpoles in an unpredictable environment. Ecology 70: 1775-1787.

Newman, R. A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. BioScience 42: 671-678.

Nijhout, H. F. 1991. The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Nijhout, H. F. 1994. Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Nijhout, H. F. 1999. Control mechanisms of polyphenic development in insects. BioScience 49: 181-192.

Nijhout, H. F. 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. Evo. Dev. 5: 9-18.

Nordeen, K. W. and E. J. Nordeen. 1988. Projection neurons within a vocal pathway are born during song learning in zebra finches. Nature 334: 149-151.

Ouellet, M., J. Bonin, J. Rodriguez, J. L. DesGanges and S. Lair. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. J. Wildlife Dis. 33: 95-104.

Palanza, P., S. Parmigiani and F. S. vom Saal. 2001. Effects of prenatal exposure to low doses of diethylstilbesterol, ó p'-DDT, and methochlor on postnatal growth and neurobehavioral development in male and female mice. Horm. Behav. 40: 252-265.

Palmer, A. R. 1985. Adaptive value of shell variation in Thais lamellosa: Effect of thick shells on vulnerability to and preference by crabs. Veliger 27: 349-356.

Passera, L. 1985. Soldier determination in ants of the genus Pheidole. In J. A. L. Watson, B. M Okot-Kotber and C. Noirot (eds.), Caste Determination in Social Insects. Pergamon, Oxford, pp. 331-346.

Pechenik, J. A., D. E. Wendt and J. N. Jarrett. 1998. Metamorphosis is not a new beginning. BioScience 48: 901-910.

Pener, M. P. 1991. Locust phase polymorphism and its endocrine relations. Adv. Insect Physiol. 3: 1-79.

Pfennig, D. W. 1992a. Polyphenism in spadefoot toad tadpoles as a locally adjusted evolutionarily stable strategy. Evolution 46: 1408-1420.

Pfennig, D. W. 1992b. Proximate and functional causes of polyphenism in an anuran tadpole. Funct. Ecol. 6: 167-174.

Pickford, D. B. and I. D. Morris. 1999. Effects of endocrine-disrupting contaminants on amphibian oogenesis: Methoxychlor inhibits progesterone-induced maturation of Xenopus laevis oocytes in vitro. Environ. Health Perspect. 107: 285-292.

Piersma, T. and R. E. Gill, Jr. 1998. Guts don't fly: Small digestive organs in obese Bar-tailed Godwits. Auk 115: 196-203.

Pinder, A. W. and S. C. Friet. 1994. Oxygen transport in egg masses of the amphibians Rana sylvatica and Ambystoma maculatum: Convection, diffusion, and oxygen production by algae. J. Exp. Biol. 197: 17-30.

Plowright, R. C. and B. A. Pendrel. 1977. Larval growth in bumble-bees. Can. Entomol. 109: 967-973.

Purves, D. and J. W. Lichtman. 1985. Principles of Neural Development. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Raatikainen, M. 1967. Bionomics, enemies, and population dynamics of Javesella pellucida (F.) (Homoptera, Delphaidae). Annales Agric. Fenniae 6: 1-49.

Rachinsky, A. and K. Hartfelder. 1990. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (Apis mellifera carnica). J. Insect Physiol. 36: 329-349.

Rasika, S., A. Alvarez-Buylla and F. Nottebohm. 1999. BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in the adult brain. Neuron 22: 53-62.

Relyea, R. A. and N. Mills. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to grey treefrog tadpoles (Hyla versicolor). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2491-2496.

Renfree, M. B. and G. Shaw. 2000. Diapause Annu. Rev. Physiol. 62: 353-375.

Sander, K. 1968. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am embryonalen Mycetom von Euscelis plebejus F. (Homoptera, Ciciadina). I. Dev. Biol. 17: 16-38

Sapp, J. 1994. Evolution by Association: A History of Symbiosis. Oxford University Press, New York.

Sato, M., T. Ochi, T. Nakase, S. Hirota, Y. Kitamura, S. Nomura and N. Yasui. 1999. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. J. Bone Miner. Res. 14: 1084-1095.

Savage, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu. Rev. Microbiol. 31: 107-133.

Schmalhausen, I. I. 1949. Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. University of Chicago Press, Chicago.

Schwemmler, W. 1974. Endosymbionts: Factors of egg patterning. J. Insect Physiol. 20: 1467-1474.

Schwemmler, W. 1989. Insect symbiosis as a model system for egg cell differentiation. In W. Schwemmler and G. Gassner (eds.), Insect Endosymbiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 37-53.

Shapiro, A. M.1968. Photoperiodic induction of vernal phenotype in Pieris protodice Boisduval and Le Conta (Lepidoptera: Pieridae). Wasmann J. Biol. 26: 137-149.

Shapiro, A. M. 1976. Seasonal polyphenism. Evol. Biol. 9: 259-333.

Shapiro, A. M. 1978. The evolutionary significance of redundancy and variability in phenotypic induction mechanisms of pierid butterflies (Lepidoptera). Psyche 85: 275-283.

Silva, E., N. Rajapakse and A. Kortenkamp. 2002. Something from "nothing": Eight weak estrogenic chemicals combined at concentration below NOECs produce significant mixture effects. Environ. Sci. Technol. 36: 1751-1756.

Spearow, J. L., P. Doemeny, R. Sera, R. Leffler and M. Barkley. 1999. Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. Science 285: 1259-1261.

Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper and J. I. Gordon. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15451-15455.

Stearns, S. C. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity: Phenotypic sources of variation among organisms can be described by developmental switches and reaction norms. BioScience 30: 436-446.

Stearns, S. C., G. de Jong and R. A. Newman. 1991. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. Trends Ecol. Evol. 6: 122-126.

Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. Science 265: 308-310.

Stone, R. 1995. Environmental toxicants under scrutiny at Baltimore meeting. Science 267: 1770-1771.

Stopper, G. F., L. Hecker, R. A. Franssen and S. K. Sessions. 2002. How trematodes cause limb deformities in amphibians. J. Exp. Zool. 294: 252-263.

Strathmann, R. R. and M. F. Strathmann. 1995. Oxygen supply and limits on aggregation of embryos. J. Mar. Biol. Assoc. UK 75: 413-428.

Strathmann R. R., L. Fenaux and M. F. Strathmann. 1992. Heterochronic developmental plasticity in larval sea urchins and its implication for evolution of nonfeeding larvae. Evolution 46: 972-986.

Swan, S. H., E. P. Elkin and L. Fenster. 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. Environ. Health Perspect. 105:1228-1232.

Takahashi, I. and 7 others. 1998. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggre-can and inhibits IL-1β expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. J. Cell. Sci. 111: 2067-2076.

Tavera-Mendoza, L., S. Ruby, P. Brousseau, M. Fournier, D. Cyr and D. Marcogliese. 2002. Response of the amphibian tadpole Xenopus laevis to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environ. Toxicol. Chem. 21: 1264-1267.

Tawfik, A. I. and 9 others. 1999. Identification of the gregarization-associated dark-pigmentotropin in locusts through an albino mutant. Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 7083-7087.

Tevini, M. 1993. W-B Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animals, Plants, Microorganisms and Materials. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Tollrian, R. and C. D. Harvell. 1999. The Ecology and Evolution of Inducille Defenses. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Tramontin, A. D., V. N. Hartman and E. A. Brenowitz. 2000. Breeding conditions induce rapid and sequential growth in adult avian song control circuits: A model for seasonal plasticity in the brain. J. Neurosci. 20: 854-861.

Turner, A. M. and W. T. Greenough. 1983. Synapses per neuron and synaptic dimensions in occipital cortex of rats reared in complex, social, or isolation housing. Acta Stereologica 2 [Suppl. 1]: 239-244.

Umesaki,Y. 1984. Immunohistochemical and biochemical demonstration of the change in glycolipid composition of the intestinal epithelial cell surface in mice in relation to epithelial cell differentiation and bacterial association. J. Histochem. Cytochem. 32: 299-304.

Van Buskirk, J. and R. A. Relyea. 1998. Natural selection for phenotypic plasticity: Predator-induced morphological responses in tadpoles. Biol. J Linn. Soc. 65: 301-328.

van der Weele, C. 1999. Images of Development: Environmental Causes in Ontogeny. SUNY Press, Albany, NY.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nature Neurosci. 2: 266-270.

Van Valen, L. 1973. Festschrift. Science 180: 488.

Via, S., R. Gomulkiewicz, G. De Jong, S. M. Scheiner, C. D. Schlichting and P. H. Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: Consensus and controversy. Trends Ecol. Evol. 10: 212-217.

Capítulo 23 Mecanismos de desarrollo del cambio evolutivo

¿Cómo llega al mundo lo nuevo? ¿Cómo nace? ¿De qué fusiones, transustanciaciones y conjunciones se forma? ¿Cómo se sobrevive, siendo como es tan extremo y peligroso? ¿Qué compromisos, qué pactos, qué traiciones a su secreta naturaleza tiene que hacer para mantener a la banda demoledora, al ángel exterminador, a la guillotina?

SALMAN RUSHDIE (1988)

La biología señala la individualidad de cada ser, y al mismo tiempo nos mantiene en la fraternidad del todo.

JEAN ROSTAND (1962)

CUANDO WILHELM ROUX ANUNCIÓ la creación de la embriología experimental en 1894, rompió muchos de los lazos que relacionaban la embriología con la biología evolutiva. Sin embargo, juró que la embriología algún día debería regresar a la biología evolutiva, trayendo con esto nuevos conocimientos sobre cómo se generan los animales y sobre cómo se pueden producir los cambios evolutivos. Sostenía que "los mecanismos de desarrollo ontogenético y filogenético tienen que ser perfeccionados". Roux pensaba que la investigación hacia los mecanismos de desarrollo de los embriones individuales (la rama ontogenética) debería avanzar más rápido que la rama filogenética (evolutiva), pero predijo que "como consecuencia de las estrechas conexiones causales entre las dos, muchas de las conclusiones que se extraen de la investigación del desarrollo individual [deberían] arrojarían luz sobre los procesos filogenéticos". Un siglo más tarde, estamos a punto de hacer realidad la profecía de Roux. La biología del desarrollo está regresando a la biología evolutiva, forjando una nueva disciplina, **la biología del desarrollo evolutiva,** a veces denominada "evo-devo" (del inglés, *evo*lution-*de*velopment [evolución-desarrollo]). Este retorno está produciendo un nuevo modelo de evolución que integra la genética del desarrollo y la genética de población para explicar la diversidad de la vida sobre la Tierra.

El principio fundamental de esta nueva síntesis evolutiva es que la evolución es causada por cambios heredables en el desarrollo de los organismos. Este punto de vista puede ser rastreado hasta Darwin, y es compatible y complementario con la opinión de evolución basada sobre genética de población en la que la evolución es causada por cambios en la frecuencia de genes entre las generaciones. La fusión de la aproximación de la genética del desarrollo con la genética de población está creando una biología evolutiva más compleja que está comenzando a explicar el origen de las especies y de los taxa superiores (Raff 1996; Gerhart y Kirschner 1997; Hall 1999; Carroll y col. 2001; Wilkins 2002).

"Unidad de tipo" y "condiciones de existencia"

Síntesis de Charles Darwin

En el siglo XIX, los debates sobre el origen de las especies marcaron dos modos de ver la naturaleza opuestos entre sí. Una opinión, defendida por Georges Cuvier y Charles Bell, se centraba sobre las *diferencias* entre las especies que permitían que cada especie se adaptara a su ambiente. Por lo tanto, la mano de los seres humanos, la aleta de la foca y las alas de las aves y murciélagos fueron vistas como maravillosos inventos, cada uno de ellos originado por el Creador, para permitir a estos animales adaptarse a sus "condiciones de existencia". El otro punto de vista, defendido por Étienne Geoffroy Saint-Hilaire y Richard Owen, era que la "unidad de tipo" (las *semejanzas –similarities–* entre los organismos, que Owen denominó "homologías") era críti-

ca. La mano humana, la aleta de la foca y las alas de los murciélagos y de las aves eran todas modificaciones del mismo plan básico (véase fig. 1-13). Al descubrir tal plan, es posible encontrar la forma mediante la cual el Creador diseñó a los animales. Las adaptaciones eran secundarias.

Darwin reconocía sus dudas sobre estos debates iniciales cuando escribió en 1859: "Se admite, en general, que todos los organismos están siendo formados sobre dos grandes leyes: unidad de tipo y condiciones de existencia". Darwin continuó explicando que su teoría debería aclarar la unidad de tipo mediante el origen desde un ancestro común. Los cambios que crearon las maravillosas adaptaciones de existencia deberían ser explicados por selección natural. Denominó a este concepto **origen con modificación.** Como se mencionó en el capítulo 1, Darwin observó que las homologías entre las estructuras embrionarias y larvarias de los diferentes filos proporcionaron excelente evidencia para el origen con modificación. Él también sostenía que las adaptaciones que parten del "tipo" y le permiten a un organismo sobrevivir en su ambiente particular se desarrollan tardíamente en el embrión. Por lo tanto, reconoció dos modos de analizar la descendencia con modificación. Se puede poner énfasis en el *origen común* al señalar las homologías embrionarias entre dos o más grupos de animales o se pueden resaltar las *modificaciones* por las que se muestra cómo fue alterado el desarrollo para producir estructuras que permitieron la adaptación de los animales a condiciones particulares.

SITIO WEB 23.1 **Lillie y Wilson (Lillie and Wilson).** A fines de 1800, dos eminentes embriólogos vinieron con propuestas que relacionaban a la embriología con la evolución de los moluscos. Wilson hacía hincapié en las homologías embriológicas como las que muestran el antepasado común; Lillie ponía énfasis en las adaptaciones embriológicas como las que muestran la selección natural. Ambas aproximaciones actualmente todavía están funcionando.

SITIO WEB 23.2 **Ley biogenética de Haeckel (Haeckel's biogenetics law).** A comienzos de 1900, una fusión de la evolución y de la embriología fue interpretada erróneamente para apoyar un modelo lineal (como opuesto al ramificado) de evolución. La interpretación de Ernst Haeckel fue que cada organismo evolucionó por el agregado terminal de un nuevo estadio al final del último organismo más "superior". Por lo tanto, vio a todo el reino animal como representado por pasos truncados del desarrollo humano.

"El maravilloso drama de la vida"

Hasta la década de 2000, "muchos biólogos de invertebrados vieron la reconstrucción de las relaciones entre los filos como un dilema sin solución... En efecto, tan tarde como en 1990, un exhaustivo resumen concluyó que las relaciones entre la mayor parte de los grupos animales superiores estaban enteramente sin resolver" (Erwin y col. 1997). Sin embargo, en la década de 1990, comenzó a surgir entre los paleontólogos, biólogos moleculares y genetistas del desarrollo un amplio consenso sobre la forma general de un árbol filogenético de la vida (véase Winnepenninckx y col. 1998; Adoutte y col. 1999; Erwin 1999). Este consenso (una representación que se muestra en la figura 23-1A) se produjo a partir de: 1) los métodos mejorados para utilizar el DNA para el análisis filogenético, teniendo en cuenta su variación dentro de los grupos animales; 2) nuevos datos sobre las secuencias génicas regulatorias conservadas tales como la de los genes Hox, que son generalmente estables dentro de un filo pero pueden divergir entre los filos; 3) evidencia morfológica para la naturaleza relacionada de algunas estructuras que alguna vez se había pensado eran distintas y 4) programas de computadora que pueden ordenar cantidades de datos enormes, sin privilegiar cualquier grupo particular de relaciones sobre las otras. Los resultados, que sorprendieron a muchos científicos, pueden ser resumidos del siguiente modo:

- El reino animal puede dividirse en Porífera (esponjas), Cnidaria y Ctenófora (medusas y portadores de peine o nueces de mar), y Bilateria. Los Poríferos carecen de un epitelio coherente o de simetría alguna. Los Cnidarios y los Ctenóforos son diploblásticos (con dos capas epiteliales, que carecen de mesodermo) y tienen simetría radial. Los Bilaterios son triploblásticos (con endodermo, mesodermo y ectodermo verdaderos), y tienen simetría bilateral.
- Bilateria puede ser dividida en dos grupos, los deuterostomas y los protostomas. Los protostomas son aquellos invertebrados que forman su boca desde la abertura del blastoporo; los deuterostomas forman la boca secundariamente, y el blastoporo marca el sitio del ano. Los deuterostomas incluyen a los equinodermos y a los cordados. (Aunque los adultos exhiben simetría radial, las larvas de equinodermos son originalmente bilaterales.)
- Los protostomas pueden ser divididos en dos grupos, el **Ecdisozoos** (animales cuyos cuerpos están cubiertos por un exoesqueleto, que por esta razón mudan a medida que crecen) y los **Lofotrocozoos** (animales que tienen la mayor parte o todo su tejido blando en contacto con el ambiente y que generalmente utilizan cilios para la alimentación o la locomoción). Cada uno de estos grupos es **monofilético**, lo cual significa que los filos en cada uno de ellos comparten un ancestro común.
- Nematodos y gusanos planos (que carecen de un celoma verdadero) habían sido considerados primeramente como grupos basales, quizás ancestrales a los protostomas y a los deuterostomas. Sin embargo, los nuevos estudios han demostrado que los nematodos pertenecen a los Ecdisozoos y los gusanos planos a los Lofotrocozoos.

SITIO WEB 23.3 **El surgimiento de los embriones (The emergence of embryos).** ¿Cómo llegaron las células individuales a sacrificar sus potenciales individuales y a generar embriones? ¿Cómo evoluciona la gastrulación? ¿Cómo surge el intestino del

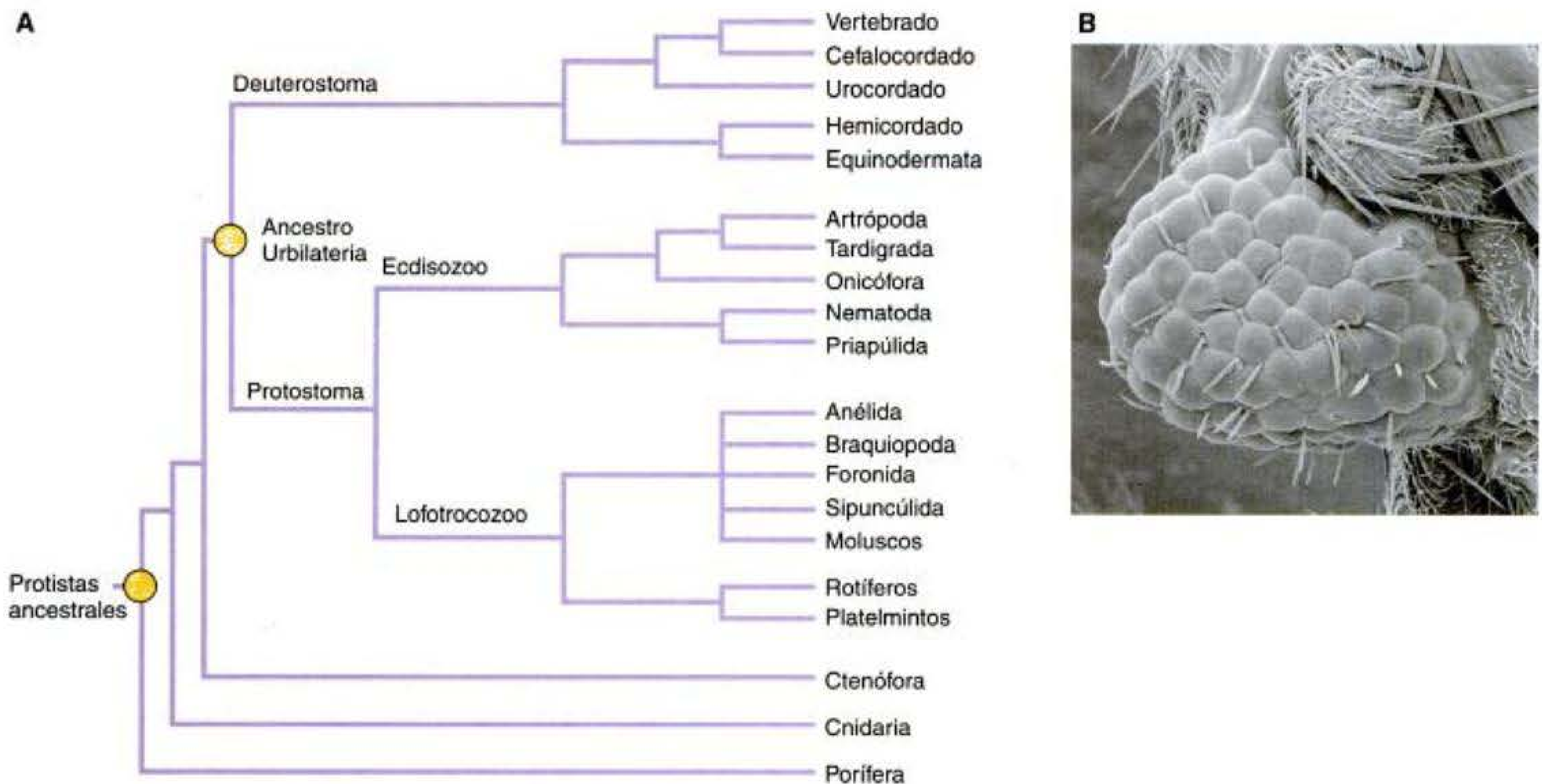


Fig. 23-1. Relaciones entre los filos. **A.** Filogenia vigente y **B**, evidencia de la conservación evolutiva de un gen regulador. El gen *Pax6* para el desarrollo del ojo es un ejemplo de un gen ancestral para los protostomas y los deuterostomas. La microfotografía muestra un omatidio surgiendo en la pata de una mosca de la fruta (un protostoma) en el que cDNA de *Pax6* de ratón (deuterostoma) fue expresado en el disco de la pata. (**A**, basado en Adoutte y col. 2000; **B**, de Halder y col. 1995, microfotografía cortesía de W. J. Gehring y G. Halder.)

deuterostoma desde el intestino del protostoma? Las respuestas podrían involucrar la depredación y la incapacidad para dividirse y ser ciliados al mismo tiempo.

SITIO WEB 23.4 **Cómo se clasifican los grupos taxonómicos (How taxonomic groups are classified).** El advenimiento de la cladística ha puesto algún orden en los modos variados de clasificación de los animales. Sin embargo, esto no significa que hay un acuerdo unánime sobre estos resultados.

La búsqueda del ancestro Urbilateria

Es dudoso que podamos hallar un representativo fosilizado del filo ancestral que dio origen a los deuterostomas y a los protostomas. Este animal hipotético a veces se lo denomina el **ancestro Urbilateria** o el **PDA** (protostoma-deuterostoma ancestro). Debido a que tal animal probablemente nunca tuvo un endoesqueleto óseo (una característica del deuterostoma) ni tampoco un exoesqueleto duro (característico de los ecdisozoos), éste no debería haberse fosilizado bien. Sin embargo, podemos aceptar lo que Sean Carroll (citado en DiSilvestro 1997) ha denominado "paleontología sin fósiles". La lógica de esta aproximación es encontrar genes homólogos que están llevando a cabo las mismas funciones en un deuterostoma (generalmente un pollo o un ratón) y un protostoma (generalmente un artrópodo como *Drosophila*). Muchos de estos genes han sido encontrados (cuadro 23-1), y sus semejanzas de estructura y función en protostomas y deuterostomas hacen a éstos probablemente como los genes surgidos en un animal que es ancestral a ambos grupos.

La proteína Pax6, por ejemplo, desempeña un papel en la formación de los ojos en vertebrados y en invertebrados (véanse caps. 4 y 5). La expresión ectópica de Pax6 da como resultado ojos extras en *Xenopus* y en *Drosophila*, representativos de los protostomas y de los deuterostomas, respectivamente (Chow y col. 1999; véanse fig. 5-15, y Carroll y col. 2001). Además, la expresión ectópica del gen *Pax6* de un deuterostoma en una larva de mosca induce ojos ectópicos en la mosca (fig. 23-1B), y la expresión ectópica del gen *Pax6* de *Drosophila* en el ectodermo de *Xenopus* induce el desarrollo del ojo en el renacuajo de rana (Halder y col. 1995; Onuma y col. 2002). Por esta razón, es una afirmación segura que los mismos genes *Pax6* están involucrados en la producción del ojo en los deuterostomas y en los protostomas. Además, al menos otros tres genes –*sine oculis*, *eyes absent*, y *dachshund*– también son utilizados para formar ojos en *Drosophila* y en vertebrados (Jean y col. 1998; Relaix y Buckingham 1999). Debido a que es extremadamente poco probable que los deuterostomas y los protostomas hayan evolucionado de manera independiente a *Pax6* (y a otros genes) –y utilizarlos a ellos independientemente para las misma función– es muy probable que el PDA haya poseído el gen *Pax6* y que lo haya utilizado para la generación de ojos.

Otro gen compartido por los deuterostomas y los protostomas es el gen *tinman* que contiene un homeobox. La proteína Tinman es expresada en el mesodermo esplácnico de *Drosophila*, residiendo finalmente en la región del mesodermo cardíaco. Los mutantes de pérdida de función de *tinman* carecen de corazón (de ahí su nombre,

Cuadro 23-1 *Genes reguladores del desarrollo conservados entre los protostomas y los deuterostomas*

Gen	Función	Distribución
Grupo *achaete-scute*	Especificación del destino celular	Cnidarios, *Drosophila*, vertebrados
Bcl2/Drob-1/ced9	Muerte celular programada	*Drosophila*, nematodos, vertebrados
Caudal	Diferenciación posterior	*Drosophila, vertebrados*
delta/Xdelta-1	Neurogénesis primaria	*Drosophila, Xenopus*
Distal-less/DLX	Formación de apéndice (eje proximodistal)	Numerosos filos de protostomas y deuterostomas
Dorsal/NFκB	Respuesta inmune	*Drosophila*, vertebrados
forkhead/Fox	Diferenciación terminal	*Drosophila*, vertebrados
Fringe/radical fringe	Formación del margen de la extremidad (cresta apical ectodérmica en vertebrados)	*Drosophila*, pollo
Hac-1/Apaf/ced4	Muerte celular programada	*Drosophila*, nematodos, vertebrados
Complejo Hox	Establecimiento del patrón anteroposterior	Ampliamente extendido entre los metazoos
lin-12/Notch	Especificación del destino celular	*C. elegans, Drosophila*, vertebrados
Otx-1, Otx-2/Otd, Emx-1, Emx-2/ems	Establecimiento del patrón anteroposterior, cefalización	*Drosophila*, vertebrados
Pax6/eyeless; Eyes absent/eya	SNC anterior/regulación del ojo	*Drosophila*, vertebrados
Grupo polycomb	Control de la expresión de Hox/diferenciación celular	*Drosophila*, vertebrados
Netrinas, proteínas Split y sus receptores	Guía axonal	*Drosophila*, vertebrados
RAS	Señal de transducción	*Drosophila*, vertebrados
sine occulus/Six3	SNC anterior/formación del patrón del ojo	*Drosophila*, vertebrados
sog/cordina, dpp/BMP4	Establecimiento del patrón dorsoventral, neurogénesis	*Drosophila, Xenopus*
tinman/Nkx 2-5	Corazón/sistema vascular sanguíneo	*Drosophila*, ratón
vnd,msh	Establecimiento del patrón del tubo neural	*Drosophila*, vertebrados

Fuente: Según Erwin 1999.

después del personaje del mago de Oz) (Bodmer 1993). En ratones, el gen homólogo se denomina *Nkx2-5*, y éste, también, se expresa originalmente en el mesodermo esplácnico y luego continúa siendo expresado en aquellas células que forman el tubo cardíaco (véase cap. 15, Manak y Scott 1994). Por lo tanto, aunque el corazón de los vertebrados y el corazón de los insectos no tienen casi nada en común excepto su capacidad para bombear líquidos parecen ser predichos sobre la expresión del mismo gen, *Nkx2-5/tinman*. Por esta razón, es probable que el PDA tuviera un sistema circulatorio con una bomba basada en la expresión del gen *Nkx2-5/tinman*.

Otro grupo de genes compartido por los deuterostomas y los protostomas son aquellos para los factores de transcripción involucrados en la formación de la cabeza (Finkelstein y Boncinelli 1994; Hirth y Reichert 1999). En *Drosophila*, el cerebro está compuesto de tres segmentos denominados **neurómeros**. Estos neurómeros están especificados por tres factores de transcripción. Los genes que codifican a estos factores son *tailless* (*tll*) y *orthodenticle* (*otd*), que son expresados predominantemente en el neurómero más anterior, y *empty spiracles* (*ems*), que es expresado en los dos neurómeros posteriores (Monaghan y col. 1995; Hirth y col. 1998). Las mutaciones de pérdida de función de *otd* eliminan el neurómero más anterior del embrión de *Drosophila* en desarrollo y las mutaciones de pérdida de función de *ems* eliminan al segundo y tercer neurómero (Hirth y col. 1995). En ranas y ratones, los homólogos de estos genes *(Otx-1, Otx-2, Emx-1, Emx-2)* también son expresados en el cerebro (Simeone y col. 1992), aunque los patrones exactos de transcripción no son idénticos (fig. 23-2). Se ha hecho experimentalmente el knock out del gen *Otx-2* (Acampora y col. 1995; Matsuo y col. 1995; Ang y col. 1996), y los ratones resultantes tenían deficiencias neurales y del mesodermo cefálico anteriores al rombómero 3. En los seres humanos, las mutaciones de *EMX2* llevan a una rara condición denominada esquizencefalia, en la que hay hendiduras a lo largo de la totalidad de la corteza cerebral (Brunelli y col. 1996). Aunque los genes *otd* y *ems* de *Drosophila* son especificados por los gradientes de Bicoid y Hunchback y los genes de mamíferos *Otx* y *Emx* son inducidos por el mesodermo y el endodermo dorsal anterior, parece que los mismos genes son utilizados para la determinación de las regiones del cerebro anterior.

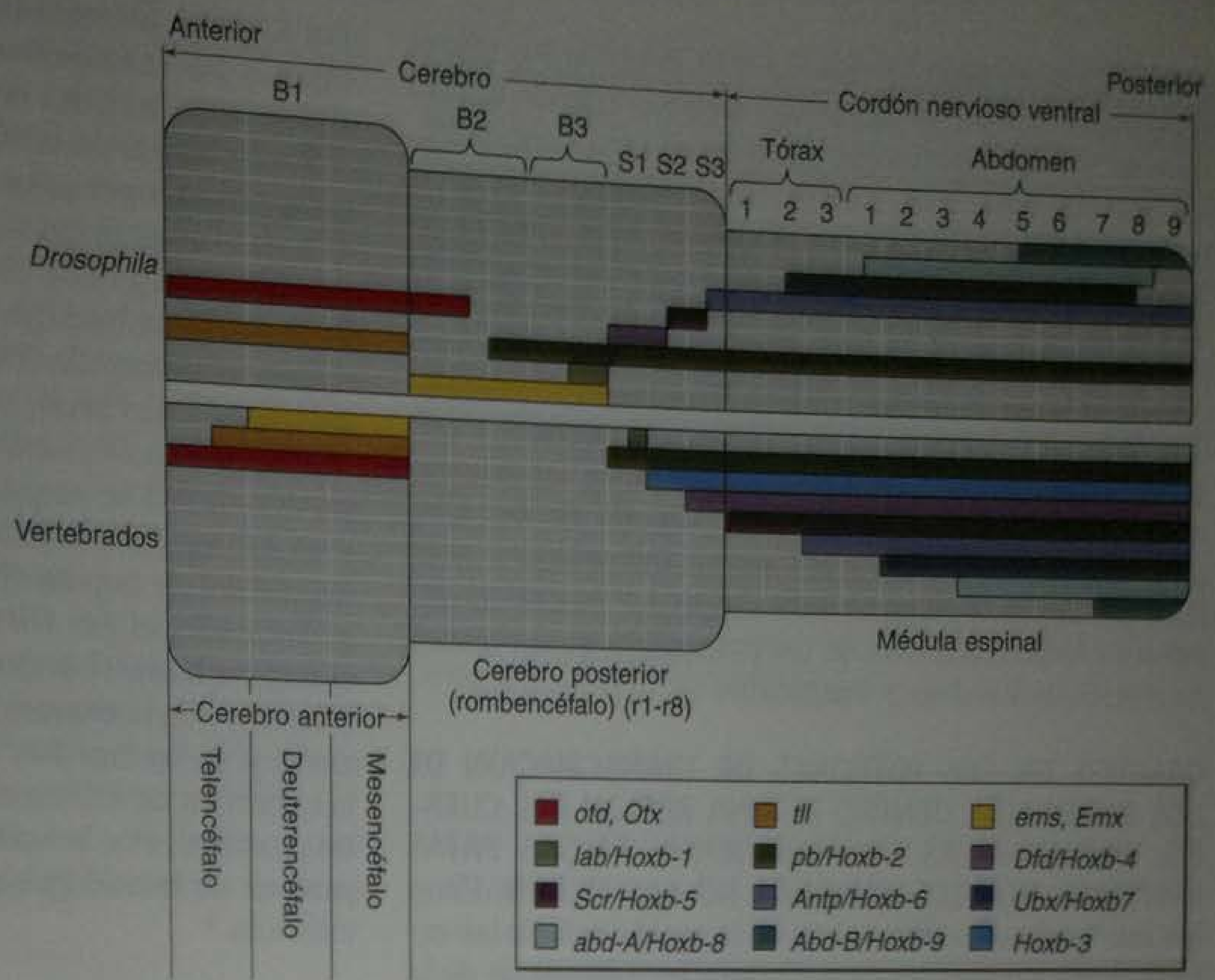


Fig. 23-2. Expresión de los factores de transcripción reguladores en *Drosophila* y en los vertebrados a lo largo del eje anteroposterior. Los genes de *Drosophila ems, tll* y *otd* se expresan en las regiones anteriores del cerebro, como los genes homólogos de vertebrados. Los genes del complejo Hox son expresados en *Drosophila* y en vertebrados en patrones semejantes en el cerebro posterior (rombencéfalo) y en la médula espinal. (Según Hirth y Reichert 1999.)

Por esta razón es probable que el ancestro de todos los organismos bilateria tuviera órganos sensoriales basados en Pax6, un corazón basado en *tinman* y una cabeza basada en *otd, ems* y *tll*. Éste también tuvo algo más: una polaridad anteroposterior basada en la expresión de los genes Hox. El análisis de los genes Hox ha dado claves críticas sobre cómo deberían producirse los cambios morfológicos mediante alteraciones del desarrollo.

Genes Hox: origen con modificación

Como se mencionó a lo largo de este libro, la expresión de los genes Hox proporciona las bases para la especificación del eje anteroposterior a lo largo del reino animal. Esto significa que la enorme variación de la forma morfológica en el reino animal es subyacente a un grupo de instrucciones comunes. En efecto, los genes Hox proporcionan una de las piezas más destacables de la evidencia de homologías profundas entre todos los animales del mundo. Como se mencionó en el capítulo 11, no solamente son homólogos los genes Hox de los diferentes filos, sino que están en el mismo orden sobre sus respectivos cromosomas (véase fig. 11-42). Los patrones de expresión entre los genes Hox también son sorprendentemente similares; los genes en el extremo 3' son expresados anteriormente; mientras que aquellos en el extremo 5' se expresan más posteriormente* (véase fig. 23-2).

Como si esta evidencia de homología no fuera suficiente, Malicki y col. (1992) demostraron que el gen humano *HOXB4* puede imitar la función de su homólogo de *Drosophila*, *Deformed*, cuando es introducido en embriones de *Drosophila* deficientes de *Dfd*. Slack y col. (1993) postularon que el patrón de expresión de los genes Hox define el desarrollo de todos los animales y que el patrón de expresión génica Hox es constante para todos los filos.*

Si el patrón de expresión génica Hox subyacente es uniforme, ¿cómo surgen las diferencias entre los filos? Parece haber al menos cinco modos por medio de los cuales las alteraciones en la unión de la proteína Hox o la expresión podrían llevar a cambios evolutivos (Gellon y McGinnis 1998; Hughes y Kaufman 2002):

- Cambios en los elementos de respuesta a la proteína Hox de los genes corriente abajo
- Cambios en un gen Hox que le dan a esta proteína nuevas propiedades
- Cambios en los patrones de transcripción génica Hox dentro de una región del cuerpo
- Cambios en los patrones de transcripción génica Hox entre las regiones del cuerpo
- Cambios en el número de genes Hox

CAMBIOS EN LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA A LA PROTEÍNA HOX DE LOS GENES CORRIENTE ABAJO: POR QUÉ UNA MARIPOSA TIENE CUATRO ALAS PERO UNA MOSCA TIENE SOLO DOS. Una de las diferencias más obvias entre una mosca de la fruta y una mariposa es que la mosca tiene dos halterios donde la mariposa tiene un par de alas posteriores (fig. 23-3). Sin embargo, el patrón de expresión de los genes Hox no difiere entre una larva de mariposa y una larva de mosca. En ambos casos, el gen

* La conservación de los genes Hox y su colinearidad exigen una explicación. Una propuesta reciente (Kmita 2000, 2002) sostiene que los genes Hox "compiten" por un potenciador distante que reconoce a los genes Hox de un modo polar. Este potenciador activa de manera más eficiente a los genes Hox en el extremo 5'. Si se cambian las posiciones de los genes Hox por recombinación o eliminación, entonces se activan diferentes genes en diferentes regiones del cuerpo y cambia la morfología.

* La siguiente discusión utilizará a los genes Hox primariamente de los filos de los artrópodos y de los cordados. Otros ejemplos son posibles, pero debido a que este libro ha proporcionado información en estos grupos, se los utilizarán como ejemplos.

Ultrabithorax (*Ubx*) se expresa a lo largo de los discos imaginales del tercer segmento torácico (desde el cual derivan las alas posteriores y el halterio; veáse fig. 9-30). Lo que distingue a un halterio de un ala posterior es la respuesta de los genes blanco de interés. La proteína Ubx regula en menos a varios genes en los discos imaginales de *Drosophila*. Muchos de estos mismos genes no son regulados por Ubx en las mariposas. Además, algunos otros genes regulados por Ubx en *Drosophila* son regulados de modo diferente en las mariposas (Carroll y col. 1995; Weatherbee y col. 1999). Por lo tanto, las diferencias en las alas entre los dípteros (insectos de dos alas, como las moscas) y los lepídopteros (mariposas y polillas) pueden ser atribuidas a los diferentes modos de respuesta a la proteína Ubx de los potenciales genes blanco de interés de los discos imaginales.

CAMBIOS EN LOS PATRONES DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES HOX DENTRO DE UNA REGIÓN DEL CUERPO: POR QUÉ LAS ORUGAS TIENEN FALSAS PATAS MIENTRAS QUE LOS GUSANOS NO LAS TIENEN. Entre los artrópodos, las diferencias en la morfología de las extremidades pueden ser causadas por las diferencias de la expresión génica Hox. Los insectos tienen seis patas como adultos, con un par originado desde cada uno de los tres segmentos torácicos. En *Drosophila*, el gen *Distal-less* (*Dll*) es crítico para proporcionar el eje proximodistal de los apéndices (véase fig. 18-15). La expresión de *Distal-less* se produce en los discos formadores de apéndices torácicos y cefálicos, pero es excluida en el abdomen por las proteínas de homeodominio abdA y Ubx. Por lo tanto, los apéndices crecen hacia patas y alas en el tórax, y hacia mandíbulas en la cabeza. Nunca se desarrollan extremidades en el abdomen.

Sin embargo, las larvas de las mariposas y polillas están caracterizadas por patas abdominales rudimentarias denominadas **falsas patas** o **propatas** (véase fig. 23-3C). Panganiban y col. (1994) clonaron al homólogo de *Distal-less* de la mariposa buckeye (*Precis*) y mapearon su expresión durante el desarrollo. Durante la parte temprana de la embriogénesis de *Precis*, el patrón de expresión de *Dll* es el mismo que en *Drosophila*. Durante al gastrulación, la expresión de *Dll* se ve primero en las regiones de la cabeza y en las regiones torácicas que darán origen a los discos imaginales de la pata. Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo, el gen *Dll* de *Precis* llega a expresarse desde el tercero hasta el sexto segmento abdominal (fig. 23-4). Mientras que la expresión de *Dll* es vista en el anillo proximal y en las "medias" de las patas verdaderas del tórax, la expresión de *Dll* en el abdomen está restringida al anillo proximal. Por lo tanto, las falsas patas del lepidóptero parecen ser homólogas a la porción proximal de las patas torácicas.*

* La expresión de *Dll* en los segmentos maxilar y labial en *Drosophila* y en *Precis* es interesante debido a que ésta es compatible con la evidencia paleontológica (Kukalova-Peck 1992) que, aunque estas estructuras de la mandíbula se han originado del primordio de la extremidad, los elementos distales de la extremidad se han perdido desde todas las mandíbulas de los artrópodos.

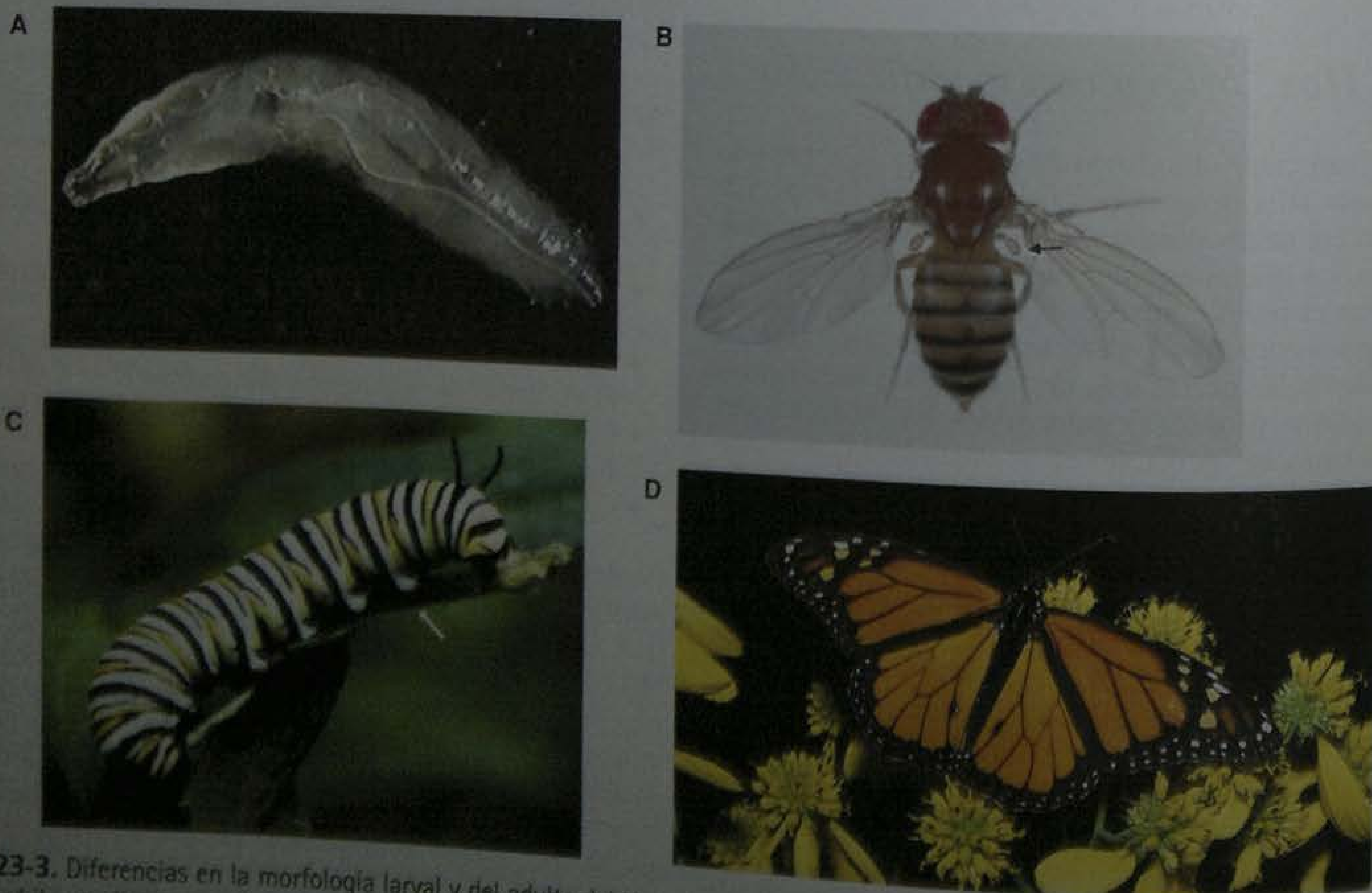


Fig. 23-3. Diferencias en la morfología larval y del adulto debidas a las diferencias de expresión génica Hox. A, B. Larva y adulto de *Drosophila*, un díptero. La larva carece de falsas patas; su extremo anterior está a la izquierda. La flecha señala uno de los halterios del adulto. C, D. Larva y adulto de *Danaus plexippus*, la mariposa monarca, un leptidóptero. El extremo anterior de la oruga está a la izquierda, y una falsa pata es indicada por una flecha. El adulto tiene alas posteriores en lugar de halterios. La regulación de los genes Hox determina la presencia de falsas patas y el blanco de los genes Hox determina si el tercer segmento torácico es para generar halterios o alas posteriores. (A, cortesía de M. Tyler; B, cortesía de E. B. Lewis; C, cortesía de G. Savage; D, por Bill Beatty/Visuals Unlimited.)

La presencia de falsas patas larvales y la expresión de *Dll* en los segmentos abdominales de *Precis* sugieren que *Dll* es regulado de modo diferente en los dípteros y leptidópteros. Dos posibilidades saltan a primera vista: en primer lugar, que los genes *Dll* de *Precis* no son expresados por las proteínas homeodominio abdA y Ubx; y en segundo lugar, que la expresión de estos genes de represión es de algún modo abolida en las regiones abdominales de *Precis*. Warren y col. (1994) demostraron que los embriones de *Drosophila* y de *Precis* tienen el mismo patrón inicial de expresión génica de *abdA* y *Ubx*. Sin embargo, en cerca del 20% del camino a través de la embriogénesis de *Precis*, la expresión de *abdA* y *Ubx* es regulada en menos en pequeñas áreas de los segmentos abdominales A3-A6, que dan origen a las falsas patas (fig. 23-5). Poco tiempo después, los genes *Dll* son expresados en aquellos "agujeros". No se sabe qué moléculas son utilizadas para regular en menos la expresión génica de *abdA* y de *Ubx* en las regiones de expresión de *Dll*. Los genes del grupo Polycomb son los principales sospechosos, debido a que pueden reprimir a ambos genes en *Drosophila*.

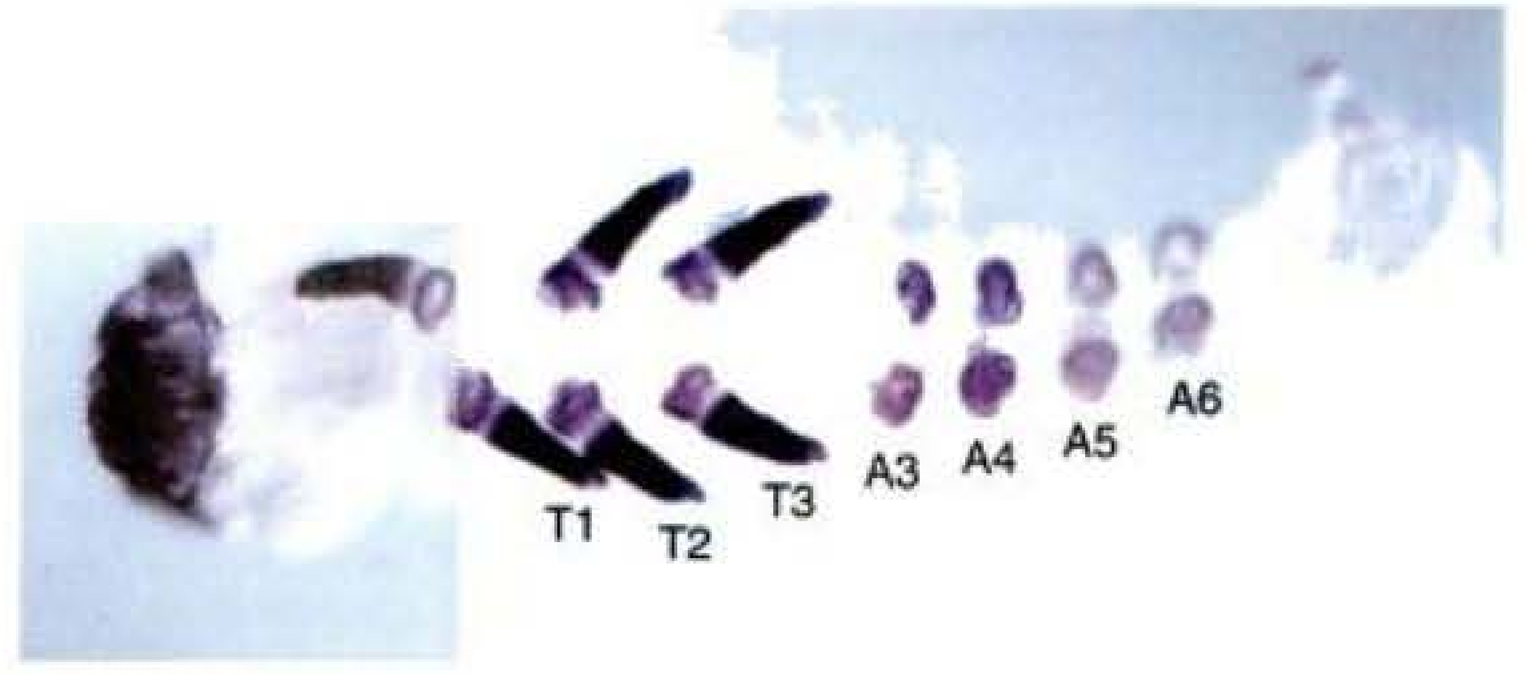
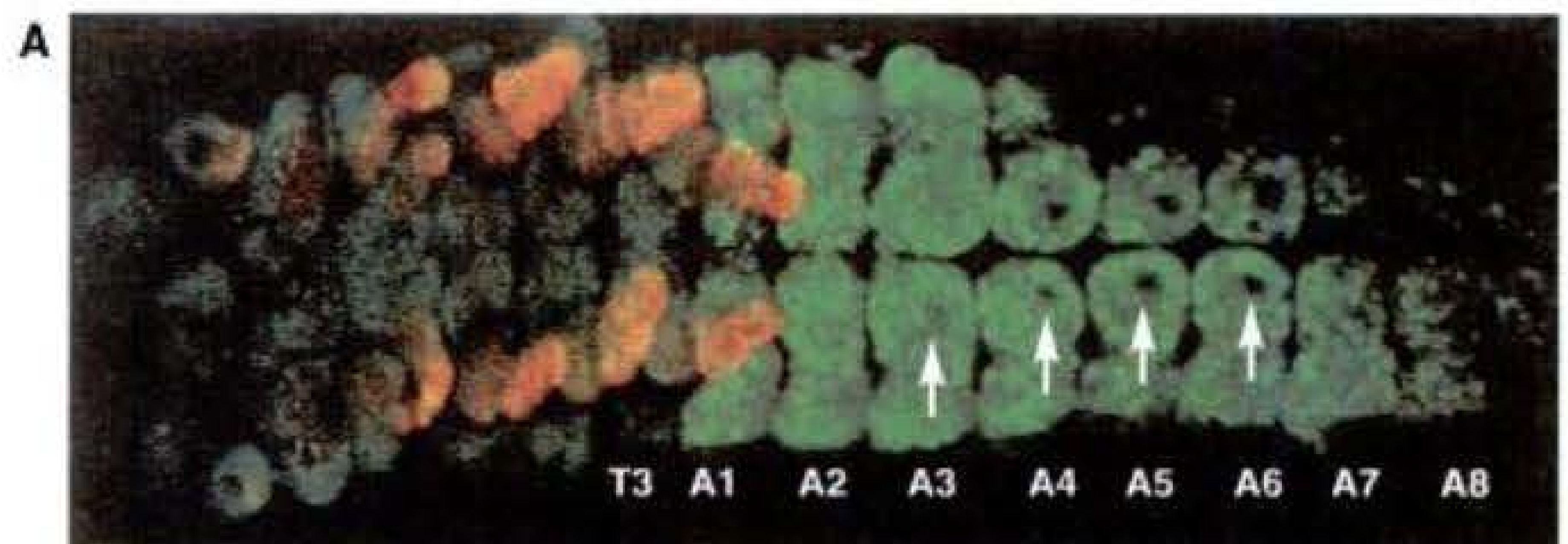


Fig. 23-4. Expresión del gen *Distal-less* en la larva de la mariposa buckeye, *Precis*. Cerca del 40% del camino a través del desarrollo embrionario en Precis ha divergido significativamente del de *Drosophila* en la que la expresión de Dll también es vista en los segmentos abdominales 3-6. (De Panganiban y col. 1994; fotografía cortesía de los autores.)

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES HOX: POR QUÉ LOS INSECTOS TIENEN SEIS PATAS MIENTRAS QUE LOS CENTÍPEDOS TIENEN MUCHAS MÁS. Los insectos tienen solo seis patas, pero la mayor parte de los otros grupos de artrópodos (pensar en arañas, milpiés, centípedos y camarón) tienen muchas más. ¿Cómo es que los insectos llegan a formar patas solamente en sus tres segmentos torácicos? La respuesta parece residir en la relación anteriormente mencionada entre la proteína Ultrabithorax y el gen *Distal-less*.

A lo largo de la mayor parte de las familias del filo artrópodos, la proteína Ubx no inhibe al gen *Distal-less*. Sin embargo, en el linaje de insectos, se produjo una mutación en el gen *Ubx* en la cual el extremo 3' original de la región codificadora de la proteína fue reemplazado por un grupo de nucleótidos que codifican un tramo de cerca de 10 residuos de alanina (fig. 23-6; Galant y Carroll 2002; Ronshaugen y col. 2002). Esta región de polialanina funciona como un represor de la transcripción de *Distal-less*. Cuando el gen *Ubx* de un camarón es modificado experimentalmente para codificar su región poli(A), éste también reprime al gen *Distal-less*. Por lo tanto la capacidad del *Ubx* de insecto para inhibir a *Distal-less* parece ser el resultado de una mutación de ganancia de función que caracteriza al linaje de insectos.

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA HOX ENTRE LOS SEGMENTOS CORPORALES: CÓMO DIFIERE EL CAMARÓN DE LA LANGOSTA. Hay diferencias sustanciales en los patrones de expresión génica Hox entre los insectos y



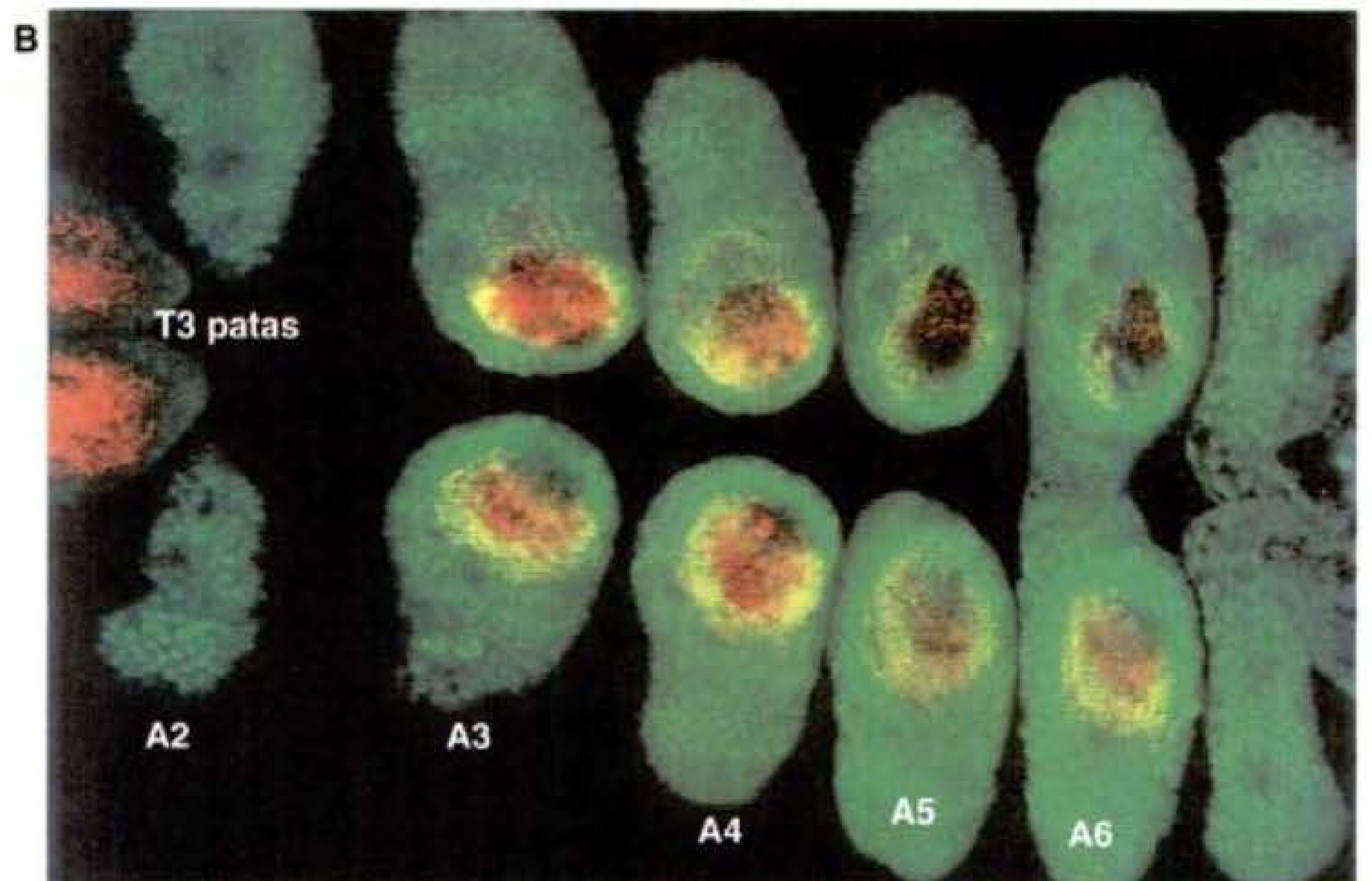


Fig. 23-5. "Agujeros" en la expresión de *abdA* y *Ubx* en el abdomen de la larva de la mariposa *Precis*. Las proteínas abdA y Ubx están teñidas de verde. La proteína Distal-less está teñida de rojo y las áreas superpuestas aparecen de amarillo. **A.** En la oruga temprana, en las extremidades torácicas (en los segmentos T1-T3) y en las mandíbulas se observa la expresión de la proteína Distal-less. Algunos segmentos abdominales (A3-A6) comienzan a tener agujeros (indicados por flechas) en los dominios de expresión de *abdA* y *Ubx*. **B.** En una oruga en estadio tardío, estos orificios se han convertido en regiones de expresión de *Distal-less*. (De Warren y col. 1994; fotografías cortesía de B. Warren, S. Paddock y S. Carroll.)

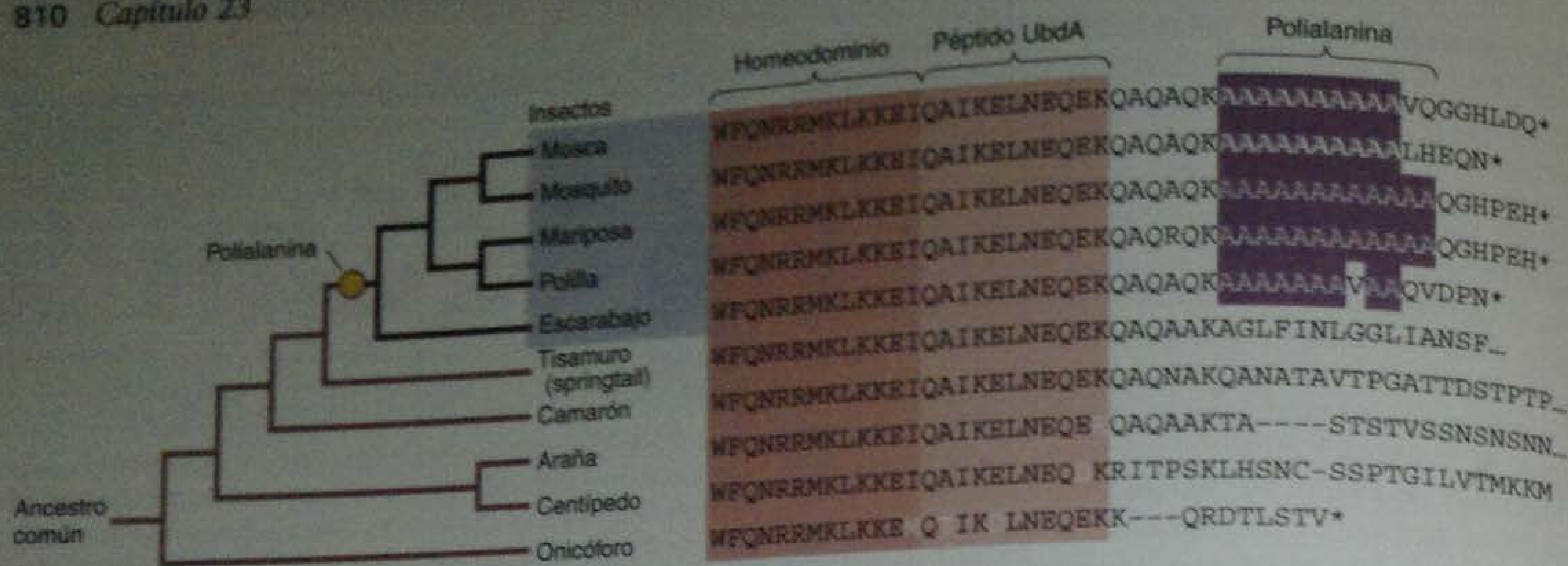
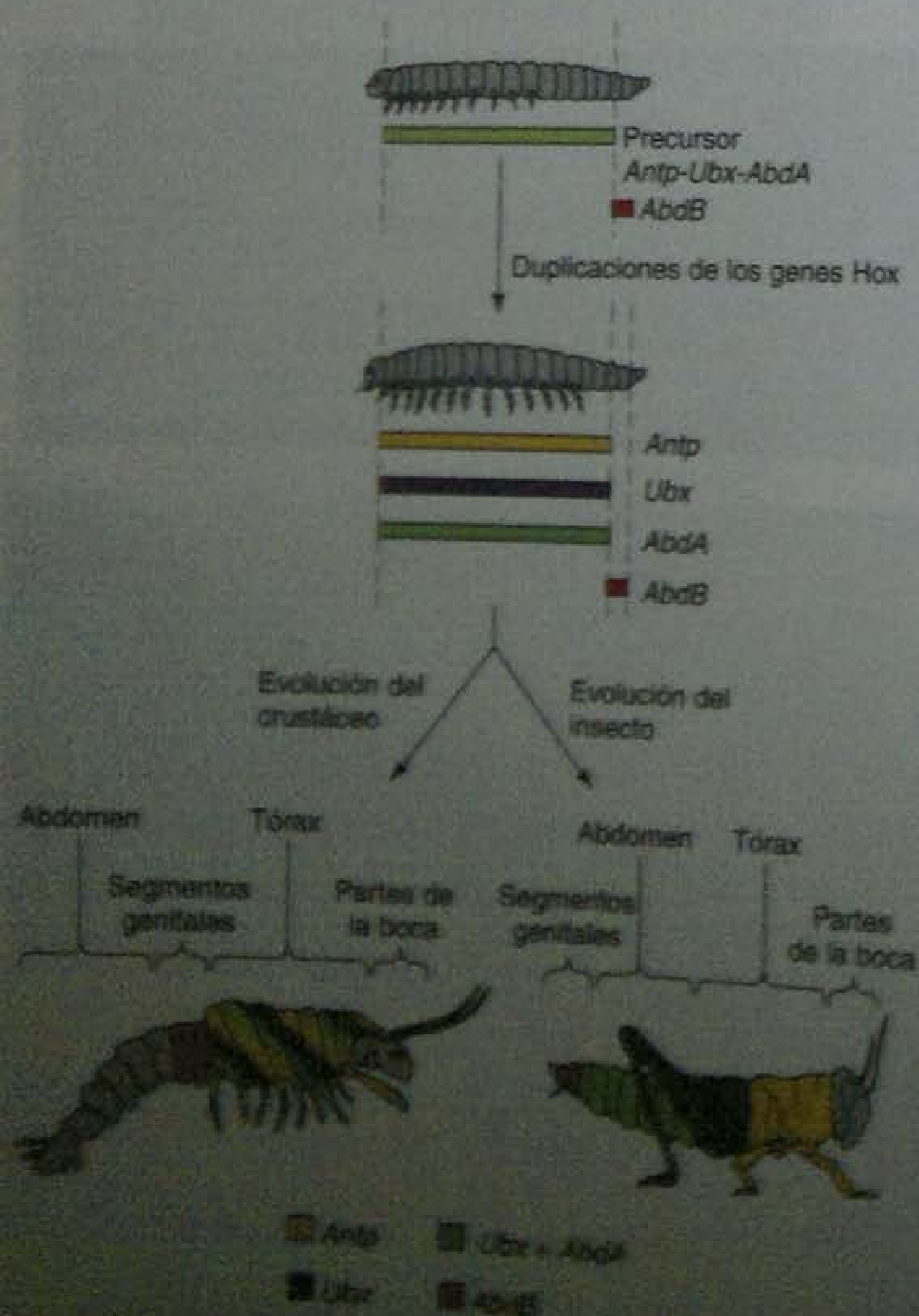


Fig. 23-6. Cambios en la proteína Ultrabithorax asociados con el cladograma del insecto en la evolución de los artrópodos. Entre los artrópodos, solamente los insectos tienen una proteína Ubx que es capaz de reprimir la expresión del gen *Distal-less* y, de este modo, inhibir las patas abdominales. Esta capacidad para reprimir a *Distal-less* se debe a una mutación que se observa solamente en el gen *Ubx* del insecto. (Según Galant y Carroll 2002; Ronshaugen y col. 2002.)

los crustáceos, y también las hay en los patrones de expresión génica Hox entre los diferentes grupos de crustáceos. Los crustáceos están caracterizados por una cabeza pregnatal (similar al acron del insecto), segmentos de la cabeza gnatal (mandibulado), seis segmentos torácicos, segmentos genitales, segmentos abdominales y un telson (fig. 23-7). Cada uno de los segmentos torácicos expresa *Antp*, *Ubx* y *abdA*, y estos genes parecen ser intercambiables en los crustáceos. En efecto, los segmentos torácicos parecen similares y no hay especialización entre ellos.

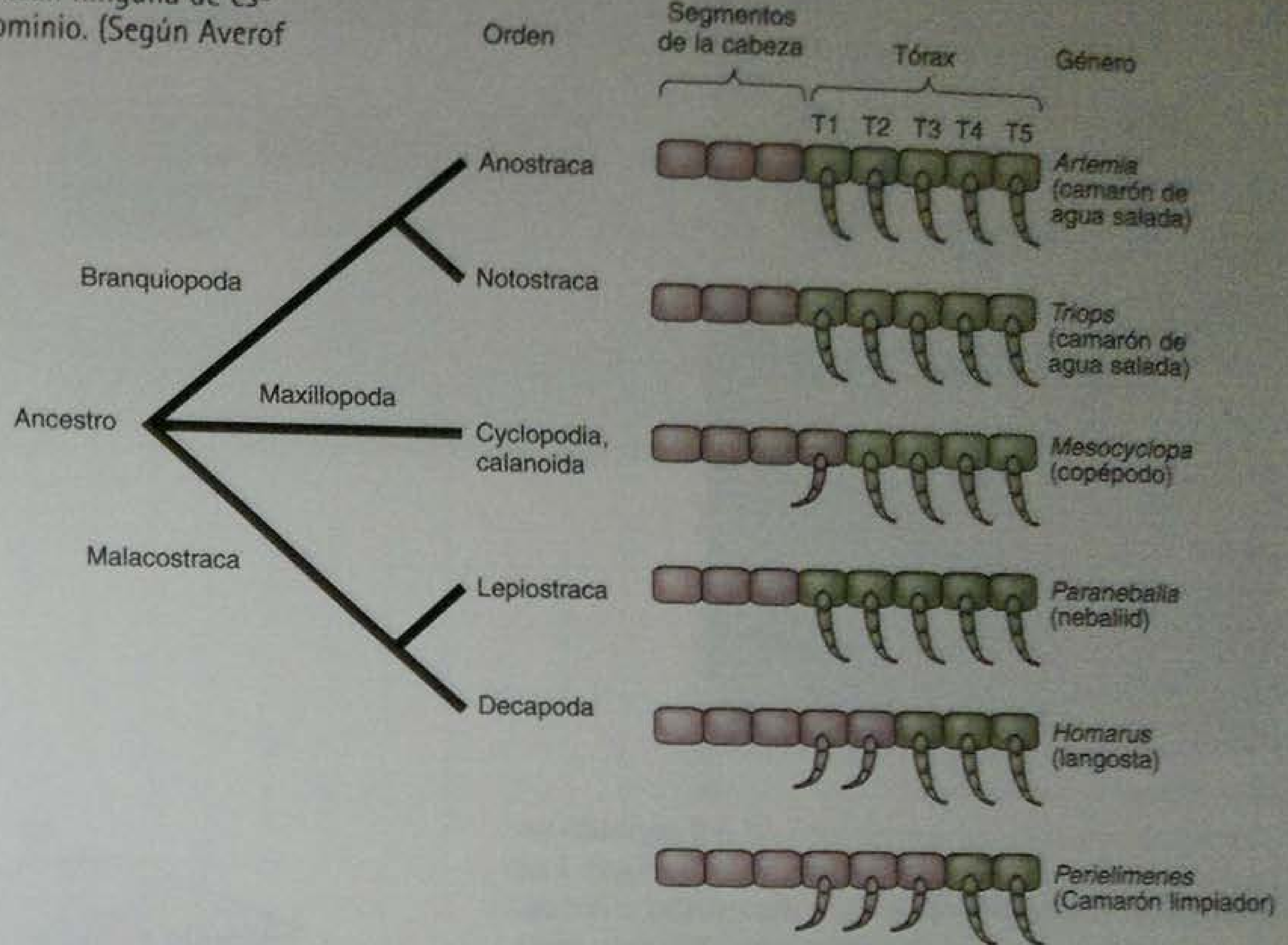


Sin embargo, en el linaje de artrópodos que dieron origen a los insectos, cada uno de estos genes asumió diferentes funciones (pero a veces superpuestas) (Averof y Akam 1995).

Pero dentro de los linajes de crustáceos, hay interesantes variaciones sobre este tema. Averof y Patel (1997) han demostrado que si un segmento torácico no expresa *Ubx* y *abdA*, la extremidad locomotora anterior se convierte en un apéndice de alimentación denominado un **maxilípedo**. Por lo tanto, los calamares de agua de mar como *Artemia* tienen una expresión uniforme de *Ubx* y *abdA* en sus segmentos torácicos, y ellos carecen de maxilípedos. Las langostas como *Homarus* carecen de la expresión de *Ubx* y de *abdA* en su primero y segundo seg-

Fig. 23-7. Expresión génica Hox y cambios morfológicos en los crustáceos. En la parte inferior de la figura, los dominios de expresión génica Hox que especifican a varias estructuras de un camarón de agua salada (crustáceo) y a un saltamontes (insecto) están codificados en color. Mientras que los dominios de expresión génica Hox se segregan en el tórax y en el abdomen del insecto, coinciden en el tórax del crustáceo. Arriba de ellos hay un modelo hipotético para la divergencia de los planes corporales del insecto y del crustáceo desde un ancestro común. Los genes *Antennapedia*, *Ultrabithorax* y *abdominal A* son muy similares y se piensa que han surgido por duplicación génica desde un solo gen en un ancestro distante de artrópodos. *Abdominal B* es expresado en los segmentos destinados a convertirse en genitales. La evidencia paleontológica sugiere que el artrópodo ancestral tenía varios segmentos torácicos idénticos, similares a los de los crustáceos extintos. En ambos casos, la expresión de *Antennapedia*, *Ultrabithorax* y *abdominal A* se ve en todo el tórax. Los crustáceos posteriormente evolucionaron segmentos de la cola. Sin embargo, los insectos, diversificaron sus segmentos torácicos y utilizaron a estos genes Hox para especificar a los segmentos de otro modo. Los ancestros de los insectos y de los crustáceos son reconstrucciones hipotéticas basadas en fósiles del Cámbrico medio. (Según Averof y Akam 1995

Fig. 23-8. Representación esquemática de la expresión de *Ubx* y *abdA* (verde) en los segmentos del tórax de diferentes tipos de crustáceos. La generación de maxilípedos se produce en los segmentos torácicos que no expresan ninguna de estas dos proteínas de homeodominio. (Según Averof y Patel 1997.)



mentos torácicos, y estos segmentos tienen maxilípedos pares (fig. 23-8). Los registros fósiles sugieren que los crustáceos más tempranos carecían de maxilípedos y que tenían segmentos torácicos uniformes. Esto podría significar que la presencia de maxilípedos es un derivado característico que evolucionó en varios linajes de crustáceos.

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA HOX ENTRE LOS SEGMENTOS CORPORALES: CÓMO LAS SERPIENTES PIERDEN SUS EXTREMIDADES. Como se describió en el capítulo 11, el patrón de expresión de los genes Hox en vertebrados determina el tipo de estructura vertebral formada. Las vértebras torácicas, por ejemplo, tienen costillas, mientras que las vértebras cervicales (cuello) y las vértebras lumbares no las tienen. El tipo de vértebra producida es especificada por los genes Hox expresados en el somita.

Una de las alteraciones más radicales del plan corporal de los vertebrados se observa en las serpientes. Las serpientes evolucionaron desde los lagartos, y parecen haber perdido sus patas en un proceso de dos etapas. La evidencia paleontológica y embriológica apoya la opinión de que las serpientes perdieron primero sus extremidades anteriores y luego sus extremidades posteriores (Caldwell y Lee 1997; Graham y McGonnell 1999). Se han encontrado fósiles de serpientes con extremidades posteriores, pero sin extremidades anteriores. Además, mientras que la mayor parte de los derivados de las serpientes (como las víboras) no tiene extremidades, las serpientes más primitivas (como las boas y las pitones) tienen fajas pélvicas y fémures rudimentarios.

Las extremidades anteriores perdidas pueden explicarse por el patrón de expresión Hox en la porción anterior de la víbora. En la mayoría de los vertebrados, la extremidad anterior se forma justo anterior al dominio de expresión más anterior de *Hoxc-6* (Gaunt 1994; Burke y col. 1995; Gaunt 2000). Caudal a este punto, *Hoxc-6*, en combinación con *Hoxc-8*, ayuda a especificar las vértebras a ser torácicas. Durante el desarrollo temprano de la pitón, no se expresa *Hoxc-6* ante la ausencia de *Hoxc-8*, de modo tal que las extremidades anteriores no se forman. En su lugar, la combinación de *Hoxc-6* y *Hoxc-8* es expresada en la mayor parte de la longitud del organismo, diciéndole a las vértebras que formen costillas a lo largo de la mayor parte del cuerpo (fig. 23-9; Cohn y Tickle 1999).

La pérdida de las extremidades posteriores se ha producido aparentemente por un mecanismo diferente. Los esbozos de las extremidades posteriores comienzan a formarse en algunas serpientes, como las pitones, pero no producen nada más que un fémur. Esto parece deberse a la carencia de expresión de *sonic hedgehog* por el mesénquima del esbozo de la extremidad. Sonic hedgehog es necesario para la polaridad de la extremidad y para el mantenimiento de la cresta apical ectodérmica (CAE). Los esbozos de las extremidades posteriores de las pitones se asemejan a los de los embriones de ratones con mutaciones de pérdida de función de *sonic hedgehog* (Chiang y col. 1996).

GENES HOX Y ATAVISMOS. Como se ha visto, la alteración de la expresión de los genes Hox puede cambiar un tipo de vértebra hacia otro. En algunos ejemplos, la mutación de un gen Hox puede producir condiciones "atavísticas", por las cuales el organismo se asemeja a un estadio evolutivo más temprano. La supresión o la regulación alterada de los genes *Hoxa-2* en ratones, por ejem-

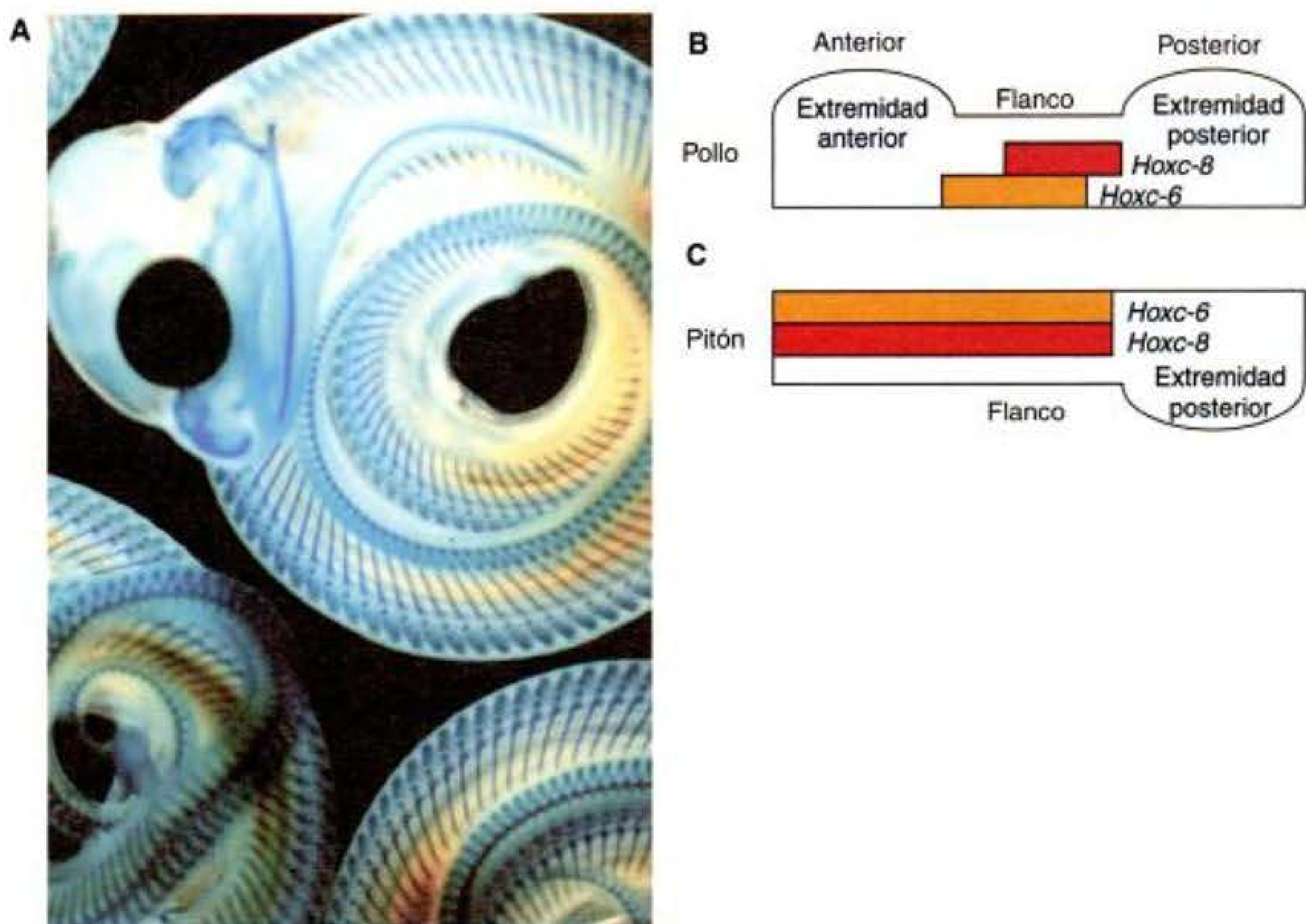


Fig. 23-9. Pérdida de las extremidades en las serpientes. A. Esqueleto de un embrión de la serpiente de *jarretera, Thamnophis*, teñido con *alcian blue*. Las vértebras con costillas son vistas desde la cabeza a la cola. **B, C.** Patrones de expresión Hox en el pollo **(B)** y en la pitón **(C)**. (Fotografía cortesía de A. C. Burke; **B, C**, según Cohn y Tickle 1999.)

plo, resulta en una transformación parcial del segundo arco faríngeo hacia una copia del primer arco faríngeo. Los fetos mutantes carecen de los huesos del estribo y del estiloides formados desde el segundo arco faríngeo, pero tienen un hueso del martillo, del yunque, timpánico y escamoso extras. También poseen un cartílago parecido a una barra que no tiene su contraparte en los ratones normales, pero que se parece al cartílago pterigocuadrado teniendo en cuenta que tendría que haber estado presente en los terápsidos, el grupo de reptiles que dio origen a los mamíferos (fig. 23-10; Rijli y col. 1993; Lohnes y col. 1994; Mark y col. 1995). Por lo tanto, los principales cambios evolutivos pueden ser correlacionados con la alteración de la expresión génica Hox en las diferentes partes del embrión.

CAMBIOS EN EL NÚMERO DEL GEN HOX: CÓMO OBTENER MÁS TIPOS CELULARES. El número de genes Hox puede desempeñar un papel en permitir la evolución de estructuras complejas. Todos los invertebrados tienen un solo complejo Hox por genoma haploide. En los invertebrados más simples –como las esponjas– parece haber solamente uno o dos genes Hox en este complejo (Degnan y col. 1995; Schierwater y Kuhn 1998). Los invertebrados más complejos, como los insectos, tienen numerosos genes Hox en este complejo. La comparación de los genes Hox de cordados, artrópodos y moluscos sugiere que había un grupo común de siete genes Hox en el ancestro Urbilateria de los protostomas y deuterostomas. En efecto, en los deuterostomas invertebrados (equinodermos y anfioxos, un cordado invertebrado), hay solamente un complejo Hox, que se parece mucho al de los insectos (fig. 23-11; Holland y García-Fernández 1996).

En el momento de evolución de las vértebras más tempranas (peces agnatos), había al menos cuatro complejos Hox. La transición desde el anfioxo hacia el pez inicial se cree que es uno de los principales saltos en la complejidad durante la evolución (Amores y col. 1998; Holland 1998; véase más adelante). Esta transición involucró la

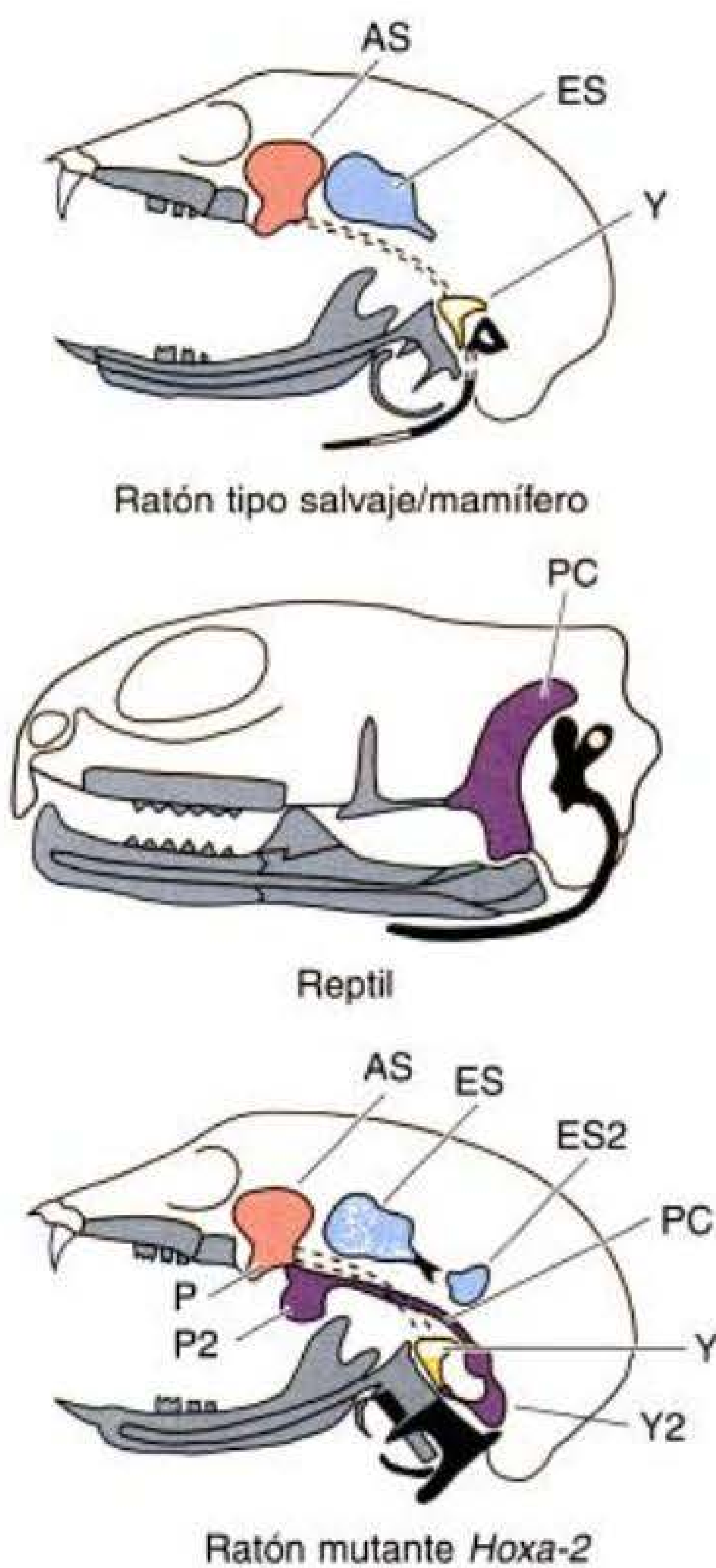


Fig. 23-10. Representación de los elementos esqueléticos derivados del primer arco faríngeo (gris) y del segundo arco faríngeo (negro) en los ratones normales y en el mutante *Hoxa-2*, y en reptiles. AS, alisfenoide; Y, yunque; Y2, yunque duplicado; P y P2, cartílago pteroideo normal y duplicado; CP, cartílago pterigocuadrado; ES, escamoso, ES2, escamoso duplicado. (Según Mark y col. 1995.)

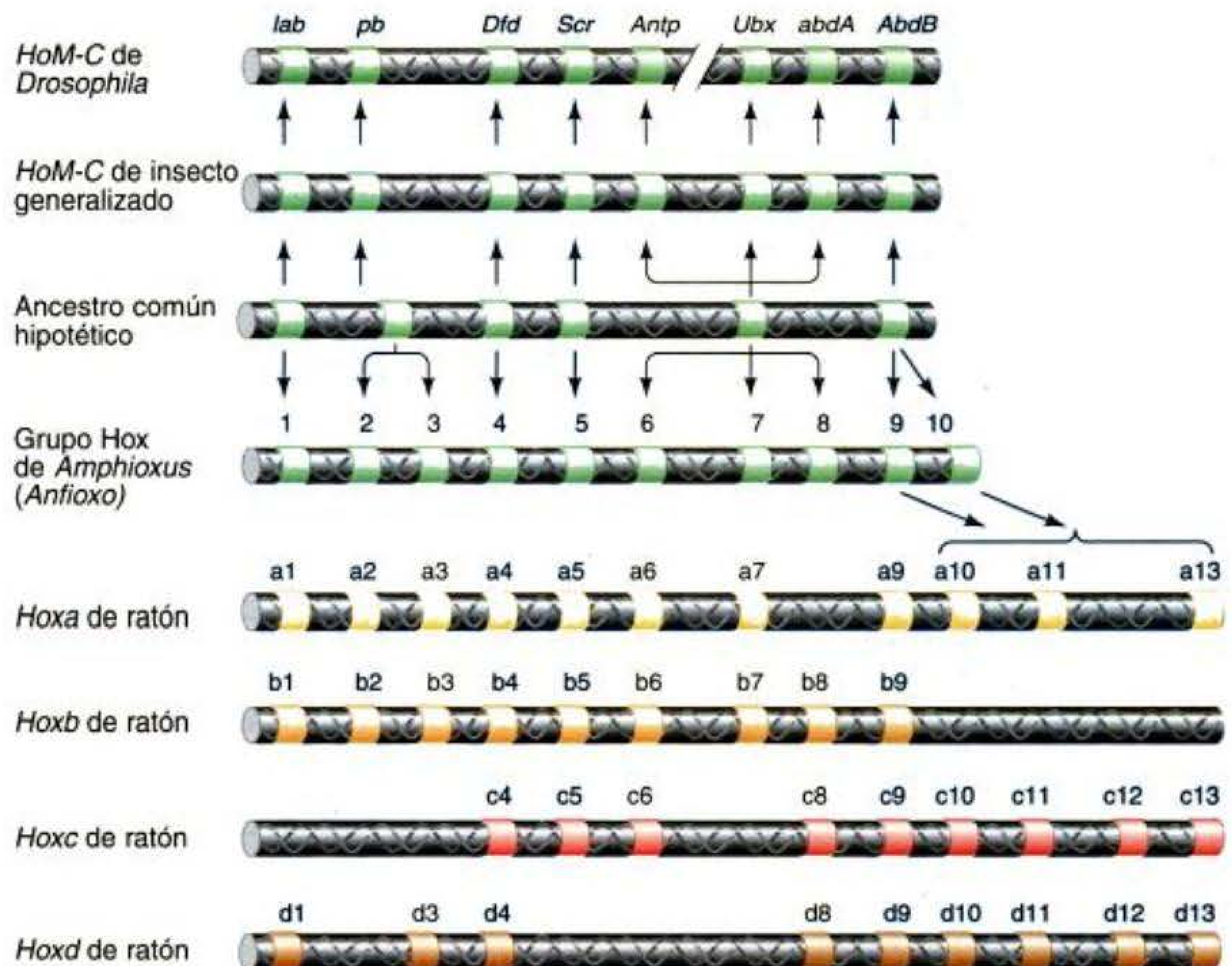


Fig. 23-11. Ascendencia postulada de los genes Hox desde un ancestro hipotético de deuterostomas y protostomas. El anfioxo tiene solamente un grupo Hox, similar al de los insectos. Los vertebrados tienen cuatro grupos Hox, ninguno de los cuales está completo. (Según Holland y García-Fernández 1996.)

evolución de la cabeza, de la cresta neural, de nuevos tipos celulares (como osteoblastos y odontoblastos), del cerebro y de la médula espinal. Como se vio en el capítulo 11, la regionalización del cerebro y de la médula espinal depende de los genes Hox, y la especificación regional de los segmentos somíticos depende de los miembros parálogos de los diferentes grupos de Hox. Holland (1998) especuló que la generación de nuevas estructuras fue permitida por la cuadruplicación del complejo génico Hox así como por las duplicaciones del gen *Distal-less*, que les permitieron servir en nuevas funciones.

SITIO WEB 23.5 **Datos de expresión génica y debates macroevolutivos (Gene expression data and macroevolutionary debates).** Tres de los principales debates en evolución son: 1) si las aves descienden de los dinosaurios, 2) cómo evolucionaron las extremidades de los tetrápodos desde la aleta caudal y 3) cómo las tortugas están relacionadas con otros reptiles. Los científicos están intentando integrar datos paleontológicos y datos de expresión de genes para resolver estas preguntas.

Información adicional y especulaciones

Cómo los cordados obtuvieron una cabeza

La cabeza de los vertebrados deriva en gran parte de la cresta neural. Por lo tanto, Hall (2000) considera que los vertebrados no son simplemente tripoblásticos, sino *tetrablásticos,* con la cresta neural constituyendo una cuarta capa germinal, y Holland y Chen (2001) propusieron denominar a los vertebrados y a sus precursores fosilizados "cristozoos", los animales con cresta. ¿Pero cómo se originó la cresta neural?

Una vez que ha sido determinado un patrón de expresión para los genes en una estructura dada, se puede intentar resolver cómo esta estructura evolucionó si se analizan los patrones de expresión de genes en animales relacionados que carecen de la estructura. Solamente los vertebrados tienen una cresta neural, y la cresta neural craneal es responsable de la formación de los huesos, del cartílago de la cara y de la mayor parte del cráneo (véase cap. 14). Mientras que no sabemos cómo se originaron las células de la cresta neural, parece que ellas evolucionaron desde células en los límites de la placa neural/epidermis desde un protocordado ancestral. Los urocordados tunicados y los cefalocordados anfioxos expresan en su línea media dorsal ectodérmica muchos de los mismos genes expresados en las células de la cresta neural de los vertebrados (Holland y Holland 2001; Wada 2001).

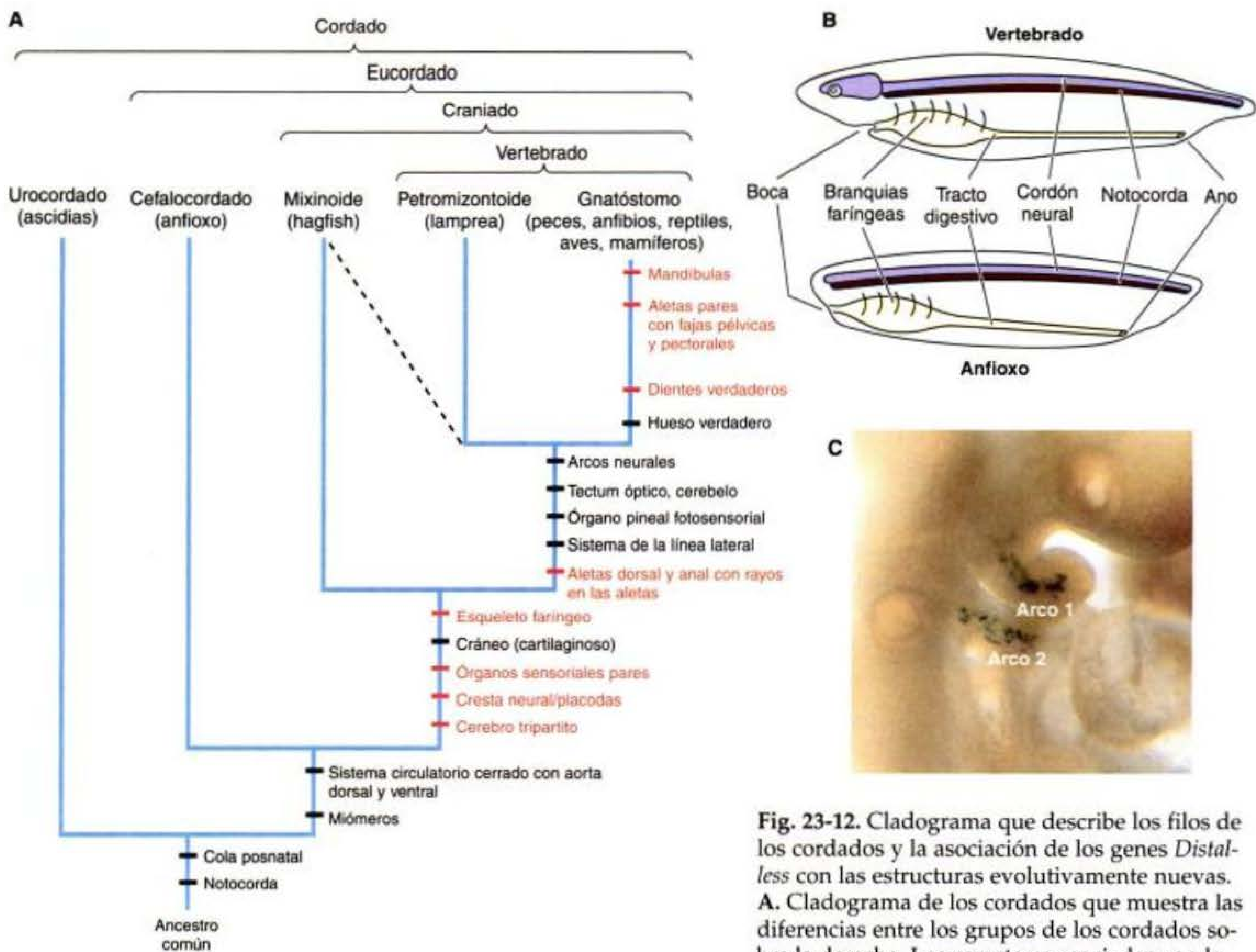


Fig. 23-12. Cladograma que describe los filos de los cordados y la asociación de los genes *Distal-less* con las estructuras evolutivamente nuevas. **A.** Cladograma de los cordados que muestra las diferencias entre los grupos de los cordados sobre la derecha. Los caracteres asociados con la expresión de *Distal-less* están impresos en rojo. La posición de los hagfishes es discutida y por esta razón está representada como una línea entrecortada. **B.** Diagrama esquemático de los planes corporales del anfioxo y de los vertebrados. **C.** Expresión en el embrión de ratón de un transgén reportero *lacZ* unido a un potenciador Hox de anfioxo. El potenciador Hox causa la expresión del transgén en las células de la cresta neural del primero y segundo arcos faríngeos, los que formarán las mandíbulas. (**A**, según Neidert y col. 2001; **B**, según Finnerty 2000; **C**, según Manzanares y col. 2000.)

El anfioxo es un cordado invertebrado que tiene una notocorda, somitas y un tubo neural hueco. Éste carece de cerebro y de estructuras faciales y, lo más importante, es que carece de células de la cresta neural. En anfioxos, el borde placa neural/epidérmico contiene células que expresan varios de los mismos genes expresados en las células de la cresta neural de vertebrados: *BMP2, Pax3/7, Msx, Dll* y *Snail*. Sin embargo, las células de los protocordados que expresan estos genes no migran ni se diferencian hacia un amplio rango de tejidos (fig. 23-12A, B; Holland y Holland 2001).

Además, muchos de los elementos reguladores *cis* necesarios para el posicionamiento de las células de la cresta neural en el cuerpo de los vertebrados también están presentes en los anfioxos. Manzanares y col. (2000) agregaron regiones regulatorias de los genes Hox de anfioxo sobre un gen *lacZ* reportero y observaron la expresión de estos genes quiméricos en embriones de ratón y de pollo. Sorprendentemente, algunas de las secuencias regulatorias Hox de anfioxos causaron la expresión del gen reportero en las células de la cresta neural y en las placodas neurales de los ratones y de los pollos (fig. 23-12C).

Dos factores de transcripción, AP2 y Distal-less, pueden haber sido críticos en la formación de las células de la cresta neural. AP2 de vertebrados es expresado en la cresta neural craneal no neural y en las células del tubo neural, aun en los peces sin mandíbula. Éste parece ser esencial para la expresión de *Hoxa-2* en las células de la cresta neural. Sin embargo, la expresión de AP2 está confinada al ectodermo no neural del anfioxo. Meulemans y Bronner-Fraser (2002) especularon que la alteración del patrón de expresión de AP2 era crítica en el establecimiento del linaje celular de la cresta neural.

Holland y col. (1996) han sugerido que el origen de la cresta neural involucra la duplicación y la divergencia de los genes *Distal-less*. *Distal-less* es hallado en todo el reino animal, y se expresa en los tejidos que sobresalen desde el eje corporal, particularmente las extremidades y las antenas (Panganiban y col. 1997). Pero en los vertebrados, *Distal-less* ha adquirido nuevas funciones. Como en *Drosophila*, el anfioxo tiene solo una copia del gen *Distal-less* por genoma haploide y también como en *Drosophila* este gen se expresa en la epidermis y en el sistema nervioso central. Sin embargo, los vertebrados tienen cinco o seis copias de *Distal-less* estrechamente relacionadas, las cuales en su totalidad probablemente se originaron desde un

único gen ancestral que se asemeja al del anfioxo (Price 1993; Boncinelli 1994; Neidert y col. 2001). Estos *Distal-less* homólogos han hallado nuevas funciones. Algunas son expresadas en el mesodermo, un lugar donde *Distal-less* no es expresado en el anfioxo. Al menos tres de los genes *Distal-less* de vertebrados funcionan en el establecimiento del patrón de las células de la cresta neural, y las supresión de estos genes provoca la ausencia o malformación de los arcos faríngeos, la cara, las mandíbulas, los dientes y el aparato vestibular (Qiu y col. 1997; DePew y col. 1999). Aunque esto aun debe demostrarse, es posible que un nuevo tipo de gen de *Distal-less* pueda haber representado un papel principal en permitir a las células ectodérmicas migratorias del anfioxo evolucionar hacia células de la cresta neural.

Vías homólogas del desarrollo

Uno de los hallazgos más excitantes de la década pasada ha sido el descubrimiento no solo de genes regulatorios homólogos, sino también de vías homólogas de transducción de la señal (Zuckerkandl 1994; Gilbert 1996; Gilbert y col. 1996), muchas de las cuales han sido mencionadas en este libro. En diferentes organismos, estas vías están compuestas de proteínas homólogas organizadas de una forma homóloga. En este sentido, la homología es similar a la que presenta una extremidad anterior humana y una aleta de una foca. Ambas partes –las proteínas– y las estructuras que ellas producen –las vías– son homólogas.

Las vías homólogas de transducción de la señal forman la infraestructura de desarrollo. Sin embargo, los blancos de estas vías pueden diferir entre los organismos. Por ejemplo, la vía Dorsal-Cactus utilizada por *Drosophila* para especificar la polaridad dorsoventral también es utilizada por el sistema inmune de mamíferos para activar a las proteínas inflamatorias (véase fig. 9-38). Esto no significa que el blastodermo de *Drosophila* es homólogo al macrófago humano. Esto simplemente significa que hay una vía muy antigua que es anterior a la separación deuterostoma-protostoma, y que esta vía puede ser utilizada en diferentes sistemas. Las vías son homólogas; los órganos que ellos forman no lo son.

La vía de transducción de la señal experimentó origen con modificación, como lo hicieron las estructuras físicas. Este fenómeno es fácilmente observable en la vía Wnt que se ha discutido a lo largo del libro. La figura 23-13 muestra cómo la vía Wnt es utilizada en varios organismos diferentes. Las vías son homólogas, pero no idénticas. Se piensa que se originaron en una vía ancestral común que es anterior a la separación deuterostoma-protostoma. En efecto, las proteínas Wnt son importantes en la capacidad de formación del eje de los cnidarios (veáse fig. 18-35), organismos que son ancestrales a la separación entre los protostomas y los deuterostomas.

Al inicio de este capítulo, se trató el tema de los genes como *Pax6* y *tinman* que parecen haber tenido sus funciones de desarrollo antes de la separación protostoma-deuterostoma. También se discutieron las vías homólogas que podrían haber sido utilizadas en estructuras similares o no. Sin embargo, parece haber algunas vías que son utilizadas para formar la misma estructura en todos los animales. Cuando las vías homólogas que producen las partes homólogas son utilizadas para la misma función en protostomas y deuterostomas, se dice que tienen "homología profunda" (Shubin y col. 1997).

Instrucciones para la formación del sistema nervioso central

Un ejemplo de homología profunda ya ha sido discutido en los capítulos iniciales. En primer lugar, como se vio en el capítulo 10, la vía cordina/BMP4 demostró que en

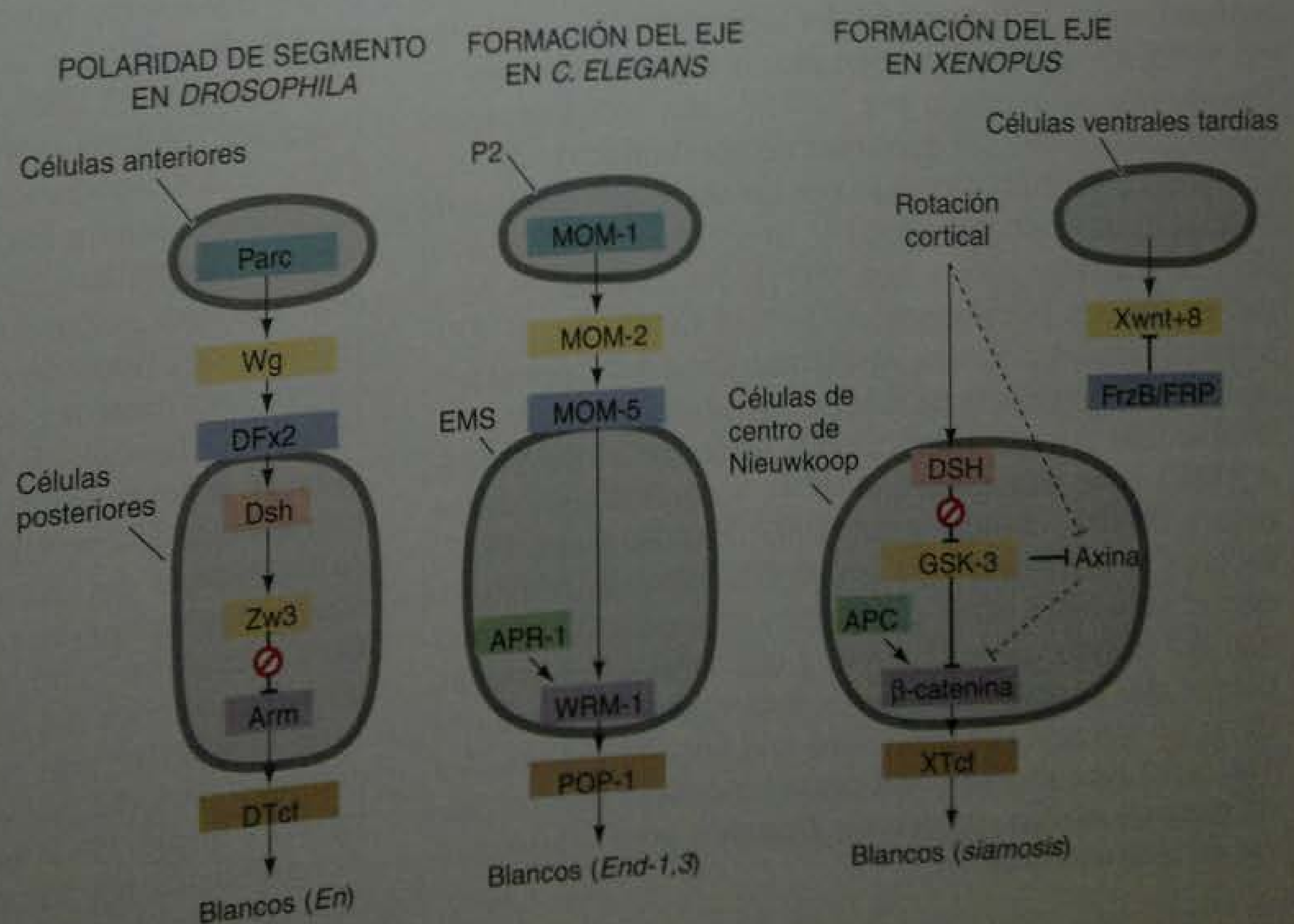


Fig. 23-13. Tres modificaciones de la vía de Wnt. Cada vía avanza verticalmente. Las células que secretan la proteína Wingless están marcadas (células anteriores en el parasegmento de *Drosophila*, la célula P2 en *C. elegans*). Las células que responden se muestran por debajo de ellas (células posteriores en el parasegmento de *Drosophila*, la célula EMS de *C. elegans*, y las células del centro de Nieuwkoop del *Xenopus*). En *Xenopus*, la proteína Dishevelled (DSH) se piensa que es llevada al centro de Niewkoop por la rotación cortical del citoplasma. Las proteínas de cada nivel son homólogas entre sí. (Según Cadigan y Nusse 1997.)

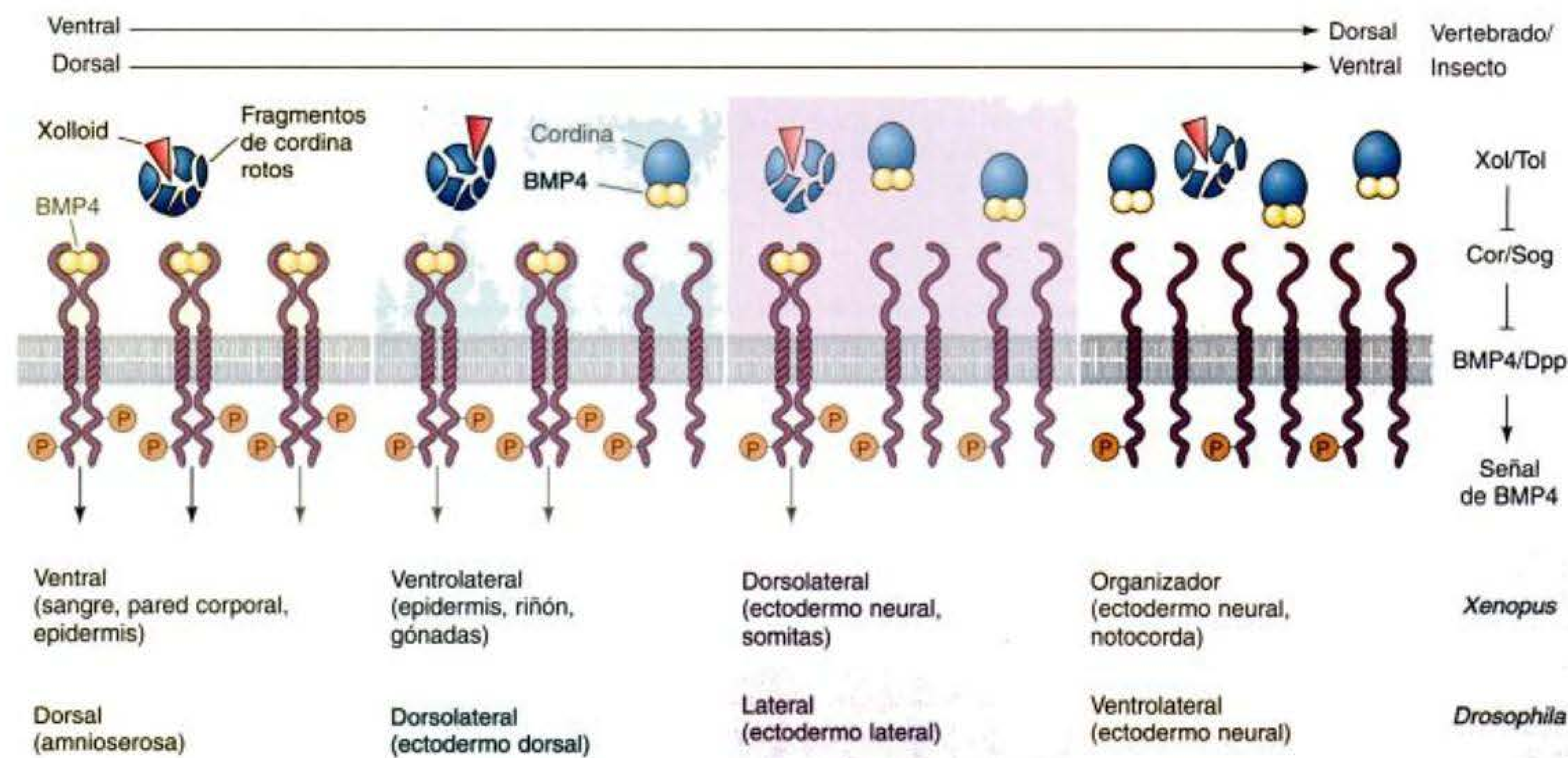


Fig. 23-14. Vías homólogas que especifican el ectodermo neural en protostomas (*Drosophila*) y deuterostomas (*Xenopus*). Ambas vías involucran a una fuente de cordina/Sog (el organizador en *Xenopus*, el ectodermo neural presuntivo en *Drosophila*) y una fuente de BMP4/Dpp (el mesodermo ventral en ranas, la amnioserosa presuntiva en moscas). En ambos ejemplos, el gradiente se forma por un suministro constante de Tolloid/Xolloid, que degrada a Sog/cordina. En ambos casos, el ectodermo neural se forma donde se impide la señalización de BMP4. (Según Dale y Wardle 1999.)

vertebrados e invertebrados, cordina/Short-gastrulation (Sog) inhibe los efectos lateralizantes de BMP4/Decapentaplegic (Dpp), permitiendo de este modo que el ectodermo protegido por cordina/Sog se convierta en ectodermo neurogénico. Estas reacciones son tan parecidas que la proteína Dpp de *Drosophila* puede inducir destinos ventrales en *Xenopus* y puede sustituir a la proteína Sog (Holley y col. 1995).

Además de esta reacción inhibitoria central, hay otras reacciones que agregar a las instrucciones de homología profunda para la formación del tubo neural de protostoma y deuterostoma. Por ejemplo, la difusión de Dpp en *Drosophila* es ayudada por Tolloid, una metaloproteasa que degrada a Sog. El gradiente de concentración de Dpp de dorsal a ventral es creado por las acciones opuestas de Tolloid (que aumenta Dpp) y Sog (que lo disminuye) (fig. 23-14; Marqués y col. 1997). En *Xenopus* y en el pez cebra, los homólogos de Tolloid (Xolloid y BMP1, respectivamente) tienen la misma función: degradan a cordina. El gradiente de BMP4 desde ventral a dorsal es establecido por las interacciones antagónicas de Xolloid o BMP1 (que aumentan a BMP4), y cordina (que disminuye a BMP4) (Blader y col. 1997; Piccolo y col. 1997). Incluso la estabilidad de los reguladores de BMP está conservada entre estos dos grupos de animales y funcionan del mismo modo (Larrain y col. 2001). Por lo tanto, parece que la naturaleza puede haber resuelto cómo producir un sistema nervioso solo una vez. El sistema nervioso del protostoma y del deuterostoma, a pesar de sus diferencias obvias, parece ser formado por la misma serie de instrucciones.

Instrucciones para la formación de los apéndices

También es posible que la naturaleza proporcione solo una serie de instrucciones para la formación de apéndices (Shubin y col. 1997). Nada puede ser mejor ejemplo de analogía que las patas de insectos y de vertebrados. Las patas de la mosca y las extremidades de los vertebrados tienen poco en común excepto en su función. Ellas no tienen estructuras semejantes. Las patas del insecto están hechas de quitina y no tienen esqueleto interno. Están formadas por el telescopaje hacia afuera de los discos imaginales del ectodermo (véase cap. 18). Las extremidades de los vertebrados, por otra parte, no tienen quitina, pero poseen un endoesqueleto óseo; son creadas mediante la interacción de ectodermo y mesodermo (véase cap. 16). Sin embargo, las instrucciones genéticas para formar estos tipos de extremidades, claramente diferentes son, por extremo, semejantes.

Como se ha visto, la proteína Sonic hedgehog es expresada, en general, en la parte posterior del esbozo de la extremidad de los vertebrados. Si ésta es expresada en la parte anterior del esbozo, se originan duplicaciones en imagen en espejo (véase fig. 16-20; Riddle y col. 1993). En *Drosophila*, la proteína Hedgehog se expresa en la porción posterior del disco imaginal del ala o de la pata. Si se expresa en una posición más anterior, se formarán duplicaciones del ala en imagen en espejo (fig. 23-15; Basler y Struhl 1993; Ingham 1994). Además, ciertos genes regulados por las proteínas Hedgehog también han sido conservados (Marigo y col. 1996). Por lo tanto, el

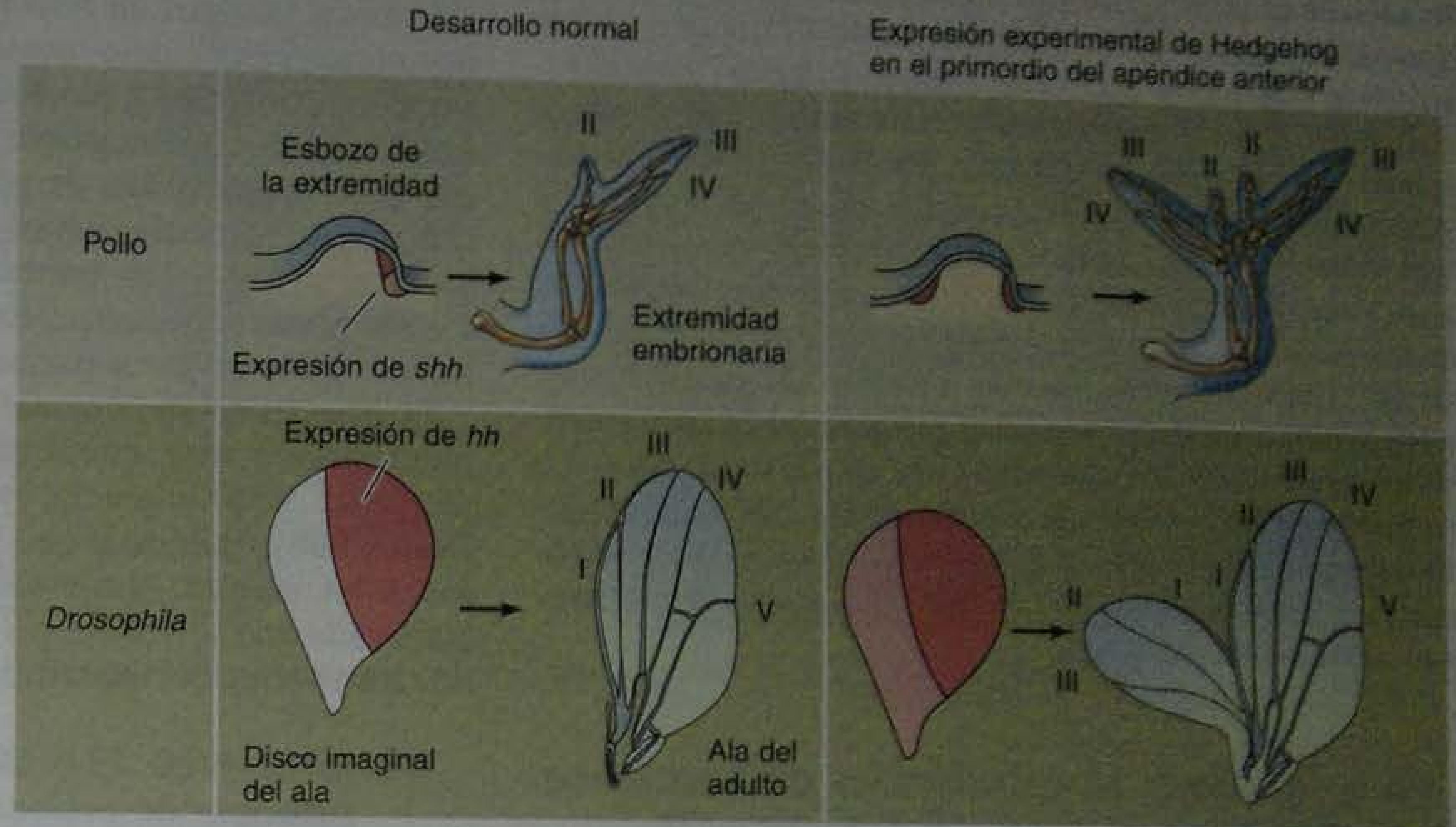


Fig. 23-15. Homología de las vías de señalización en la formación de los ejes anteroposterior en los apéndices de *Drosophila* y del pollo. Un esbozo de extremidad del pollo expresa la proteína Sonic hedgehog en su región posterior. Si Sonic hedgehog también es expresada en una región anterior, la extremidad anterior desarrolla una duplicación con imagen en espejo del eje anteroposterior. Un disco del ala de *Drosophila* expresa Hedgehog en su compartimento posterior. Si Hedgehog también es expresada en el compartimento anterior, el ala desarrolla una duplicación en imagen en espejo del eje anteroposterior. (Según Ingham 1994.)

eje anteroposterior parece ser especificado del mismo modo en los apéndices de vertebrados y de insectos. El eje dorsoventral parece ser especificado del mismo modo. Los compartimentos ventrales de la extremidad de insectos y de vertebrados parecen ser especificados por la expresión del gen *engrailed* (Davis y col. 1991; Loomis y col. 1996), mientras que el compartimento dorsal es definido por *apterous* (en insectos) o su pariente *Lmx1* (en vertebrados) (fig. 23-16).

La formación del eje proximodistal también procede de modo semejante en los apéndices de vertebrados y de invertebrados. En los insectos, el margen del ala se forma en el borde entre las células dorsales y las células ventrales. Las células dorsales expresan la proteína Apterous, y ésta activa la expresión de Fringe. La interacción de la proteína Fringe con las células ventrales lleva al crecimiento de la hoja del ala hacia afuera desde la pared corporal. Inesperadamente, una cascada muy similar induce la evaginación de la extremidad de los vertebrados. La cresta apical ectodérmica (CAE) se forma en la unión de las células dorsales con las células ventrales. Las células dorsales expresan Radical fringe, un homólogo de verte-

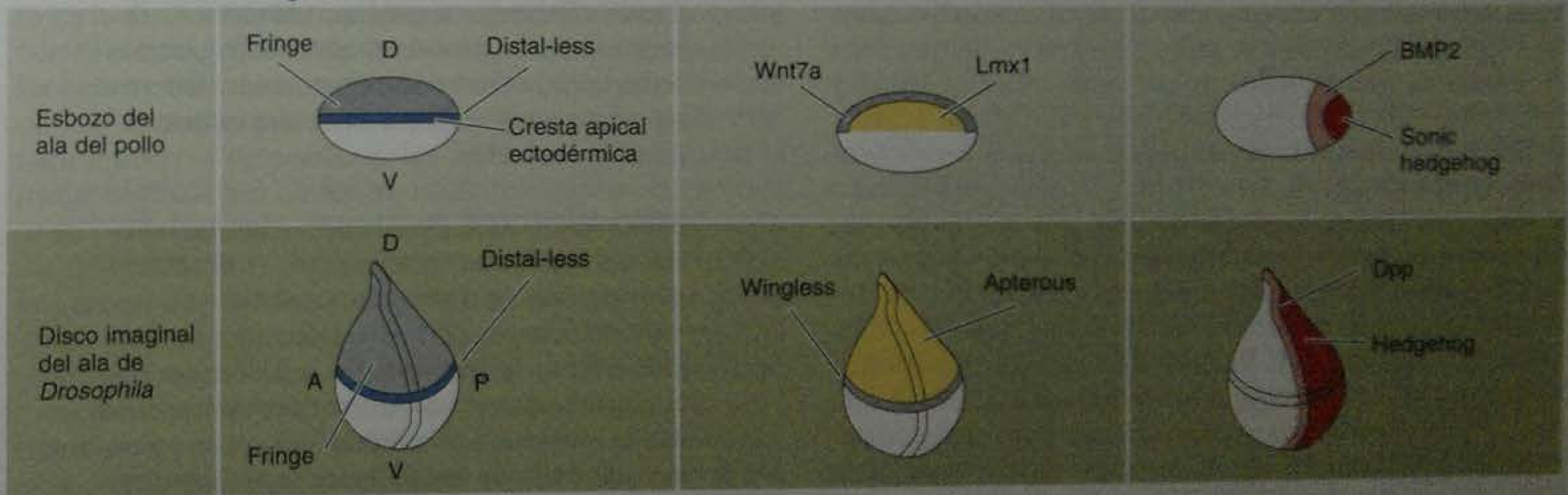


Fig. 23-16. Homología profunda de las extremidades. La misma serie de proteínas es utilizada para establecer la polaridad de las extremidades en los deuterostomas (pollo) y en los protostomas (*Drosophila*). Los paneles superiores representan a los esbozos de la extremidad del pollo con la región dorsal hacia arriba y la cresta apical ectodérmica mirando al observador. Los paneles inferiores representan el disco del ala de *Drosophila* con la región dorsal hacia arriba y su lado anterior a la izquierda. **A.** El eje proximodistal es especificado por la proteína Distal-less en la región más distal del esbozo de la extremidad o del disco. Esta proteína se expresa en la unión donde las células dorsales que contienen Fringe se encuentran con las células ventrales. **B.** El establecimiento del patrón dorsoventral es especificado por la expresión de la proteína LIM, Apterous (*Drosophila*) o Lmx1 (pollo), en la porción dorsal del disco o del esbozo. Una proteína Wnt (Wingless en *Drosophila*, Wnt7A en el pollo) induce esta expresión. **C.** El establecimiento del patrón anteroposterior es llevado a cabo mediante la expresión de Hedgehog en la región posterior del disco o del esbozo. Hedgehog, a su vez, activa a BMP que puede transmitir una señal a otras células.

brados de la proteína Fringe. Esta proteína es crítica en la
formación de la CAE. Es interesante destacar que las
mismas vías en las que estas proteínas llegan a estar lo-
calizadas difiere enormemente entre estos filos. Radical
fringe, por ejemplo, es inducida por los factores de creci-
miento fibroblástico, y éste induce a la CAE a producir
más factores de crecimiento fibroblástico para la evagi-
nación de la extremidad. Los factores de crecimiento fi-
broblástico no desempeñan ningún papel en el desarrollo
de la extremidad del insecto. Incluso las instrucciones
para la evaginación y polaridad parecen ser esencialmen-
te las mismas en los insectos y en los invertebrados. La
naturaleza puede haber evolucionado los mecanismos para formar un apéndice solo una vez, en el PDA, y artrópodos y vertebrados utilizan modificaciones que procesan hasta el día de hoy.*

Modularidad: la condición previa para la evolución a través del desarrollo

¿Cómo puede cambiar el desarrollo de un embrión cuando el desarrollo es sutilmente puesto a punto y complejo? ¿Cómo se pueden producir tales cambios sin destruir al organismo entero? Se pensaba que el único camino que promovía la evolución era agregar un peldaño más al final del desarrollo embrionario, pero ahora se sabe que aun los estadios tempranos pueden ser alterados para producir novedades evolutivas. La razón por la que pueden producirse los cambios en el desarrollo es porque el embrión, como en el organismo adulto, está compuesto de **módulos** (Riedl 1978; Bonner 1988; Bolker 2000).

Los organismos están construidos de unidades que son coherentes dentro de ellos y además son parte de una unidad de mayor tamaño. Por lo tanto, las células son partes de los tejidos, las que son partes de los órganos, los que a su vez son partes de los sistemas y así sucesivamente. Tal sistema anidado de modo jerárquico ha sido denominado una organización modular de nivel interactivo (Dyke 1988). El desarrollo se produce a través de una serie de módulos diferenciados y que interactúan (Gilbert y col. 1996; Raff 1996; Wagner 1996; von Dassow y Munro 1999). Los módulos de desarrollo incluyen los campos morfogenéticos (p. ej., los descritos para la extremidad o el ojo), las vías de transducción de la señal (como las mencionadas antes), los discos imaginales, los linajes celulares (como la masa celular interna o el trofoblasto), los parasegmentos de insectos y los rudimentos de los órganos de los vertebrados. Incluso las regiones que forman los potenciadores de los genes son modulares. Por lo tanto, si un gen particular pierde un elemento potenciador modular o lo gana, el organismo que contiene este alelo particular expresará este gen en diferentes lugares o en diferentes tiempos en relación con aquellos organismos que conservan el alelo original. Esto puede causar el desarrollo de diferentes morfologías (Sucena y Stern 2000). Los elementos potenciadores de la modularidad permiten que series particulares de genes se activen en conjunto y que un gen particular llegue a ser expresado en varios lugares diferentes. Las unidades modulares permiten que ciertas partes del cuerpo cambien sin interferir con las funciones de las otras partes.

El principio fundamental de la modularidad permite tres procesos para alterar el desarrollo: disociación, duplicación y divergencia, y co-opción (reclutamiento) (Raff 1996). Debido a que los módulos son hallados en todos los niveles, desde el molecular al organismal, no sorprende que se vean estos procesos funcionando en todos los niveles del desarrollo.

SITIO WEB 23.6 **Modularidad como un principio de evolución (Modularity as a principle of evolution).** Las estructuras complejas son creadas por el surtido de módulos preexistentes. Es insensato considerar a una proteína como una colección de átomos. Ésta es un ensamblaje ordenado de aminoácidos que ya se habían formado desde los átomos. La modularidad permite que se produzca la evolución mediante la formación de componentes que pueden ser modificados individualmente.

SITIO WEB 23.7 **Progresión correlacionada (Correlated progression).** En muchos casos, los módulos deben co-evolucionar. Las mandíbulas (maxilares) superiores e inferiores, por ejemplo, tienen que encajar entre ellas de manera correcta. Si una cambia, entonces la otra debe hacerlo. Si las proteínas que unen espermatozoides sobre el gameto femenino cambian, entonces lo deben hacer las proteínas que unen gametos femeninos sobre el espermatozoide. Este sitio analiza los cambios correlacionados durante la evolución.

SITIO WEB 23.8 **Progresión correlacionada en animales domésticos (Correlated progression in domestic animals).** La domesticación parece ser la selección para las condiciones neoténicas. En la selección por la plasticidad de la conducta, también se producen cambios en la forma del cráneo y en los patrones de pigmento. Este fenómeno también puede observarse en los intentos actuales de domesticar a los lobos y zorros salvajes.

Disociación: heterocronía y alometría

La modularidad del desarrollo permite cambios espaciales y temporales. Por medio de una mutación o de la perturbación ambiental, una parte del embrión puede cambiar sin que cambien las otras partes.

* Además de estas semejanzas, también hay diferencias inequívo-
cas en la formación de los apéndices entre los insectos y los verte-
brados. Por ejemplo, los insectos no utilizan los genes de FGF ni
los genes Hox para establecer el patrón del eje proximodistal (véa-
se Wilkins 2002 para una discusión completa al respecto). Una po-
sibilidad interesante es que ambos tipos de extremidades se origi-
naron de las modificaciones de los programas utilizados para for-
mar algunas otras evaginaciones distales en el PDA, como las ge-
nitales (Knoll y Carroll 1999).

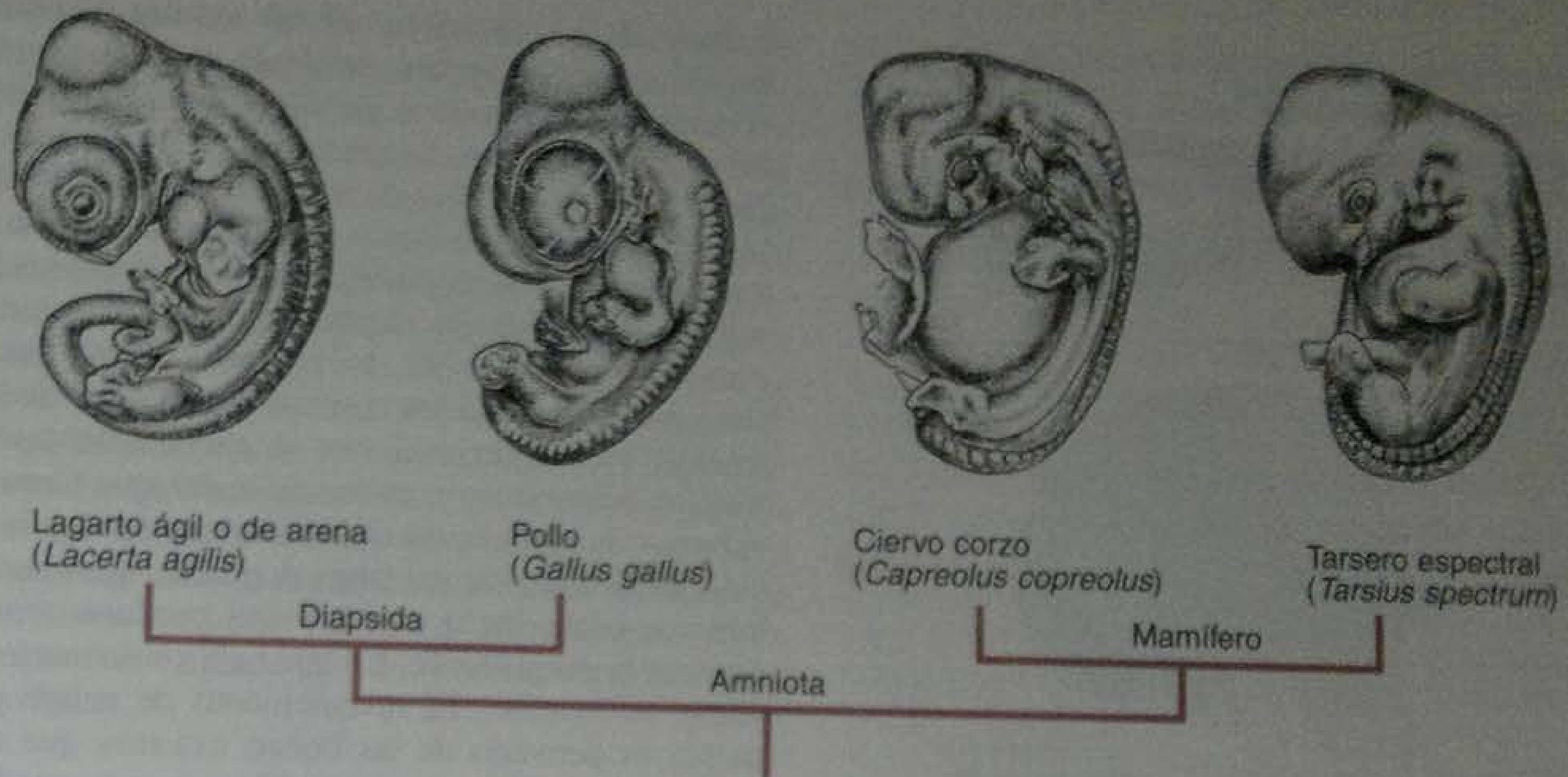


Fig. 23-17. Alometría y modularidad en el ojo de vertebrados. En los amniotas diápsidos (reptiles y aves), el desarrollo del ojo comienza relativamente temprano, y hacia el estadio de faríngula, el embrión está caracterizado por grandes ojos. Sin embargo, en los mamíferos, el desarrollo del ojo se inicia tardíamente y el ojo es mucho más pequeño en relación con el cuerpo. (Según Jeffery y col. 2002; dibujados por Nancy Haver.)

La **heterocronía** es un cambio en el tiempo relativo de dos procesos de desarrollo desde una generación a la siguiente. En otras palabras, un módulo puede cambiar su expresión temporal en relación con los otros módulos del embrión. Esta modularidad temporal del desarrollo puede apreciarse cuando se analizan los embriones amniotas tempranos y se observa el desarrollo de los ojos en relación con otras regiones del cuerpo (fig. 23-17). Los ojos de las aves y los de los lagartos inician el desarrollo antes que los ojos de los mamíferos y son, por esta razón, proporcionalmente mucho más grandes que los ojos de mamíferos cuando alcanzan el estadio de faríngula (Jeffery y col. 2002). En realidad ya se ha visto este concepto en la discusión sobre neotenia y progénesis en relación con la metamorfosis (véase cap. 18). En las salamandras, las heterocronías en las que el estadio larval es conservado son causadas por cambios genéticos en la capacidad para inducir o responder a las hormonas que inician la metamorfosis. Sin embargo, otros fenómenos de heterocronía son causados por la expresión heterocrónica de ciertos genes. Por ejemplo, el desarrollo directo de algunos erizos de mar involucra la activación temprana de los genes adultos y la supresión de la expresión génica larval (Raff y Wray 1989). La heterocronía puede también dar características larvales a un organismo adulto, como en el tamaño pequeño y en las membranas interdigitales de los pies de las salamandras arbóreas (fig. 23-18) o en el ritmo de crecimiento fetal del tejido cerebral del recién nacido humano (véase cap. 12).

SITIO WEB 23.9 **Heterocronía en la evolución (Heterochrony in evolution).** La heterocronía es un importante medio de disociación del desarrollo de una porción del cuerpo con respecto a otra. Se ha visto que ésta juega papeles críticos en la evolución del desarrollo directo de los erizos de mar, de las salamandras arbóreas y de los monos sin pelo.

Otra consecuencia de la modularidad es la **alometría**. La alometría se produce cuando diferentes partes de un organismo crecen a diferentes *velocidades* (Huxley y Teissier, 1936; Gayon 2000; véase cap. 1). La alometría puede ser muy importante en la formación de variantes de planes corporales dentro de un filo. Tales cambios diferenciales en la velocidad de crecimiento pueden involucrar la alteración de la sensibilidad de una célula blanco a los factores de crecimiento o la alteración de las cantidades de factores de crecimiento producidos. Nuevamente, la extremidad del vertebrado puede proporcionar un ejemplo útil. Las diferencias locales entre los condroci-

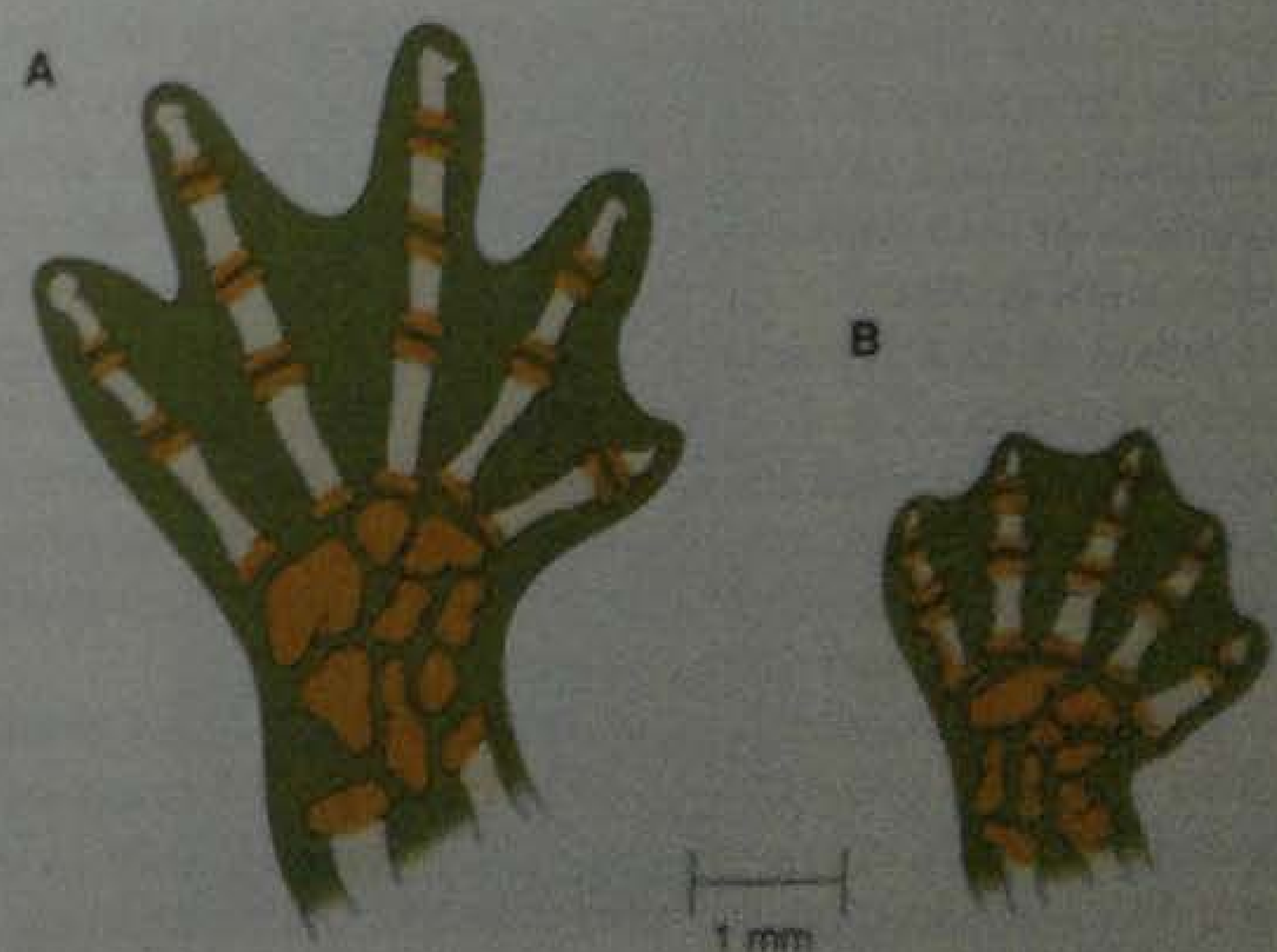


Fig. 23-18. La heterocronía en *Bolitoglossa* puede crear una salamandra que trepa a los árboles. A. Pie de un adulto *B. rostratus*, una salamandra terrestre. B. Pie de un adulto *B. occidentalis*, una salamandra arbórea. Los pies, el cráneo y el tamaño del cuerpo del adulto de *B. occidentalis* se asemejan a los juveniles de *B. rostratus*. Debido a que los dígitos no se han expandido sin pasar las membranas interdigitales, los pies pueden producir succión para trepar árboles. (Según Alberch y Alberch 1981.)

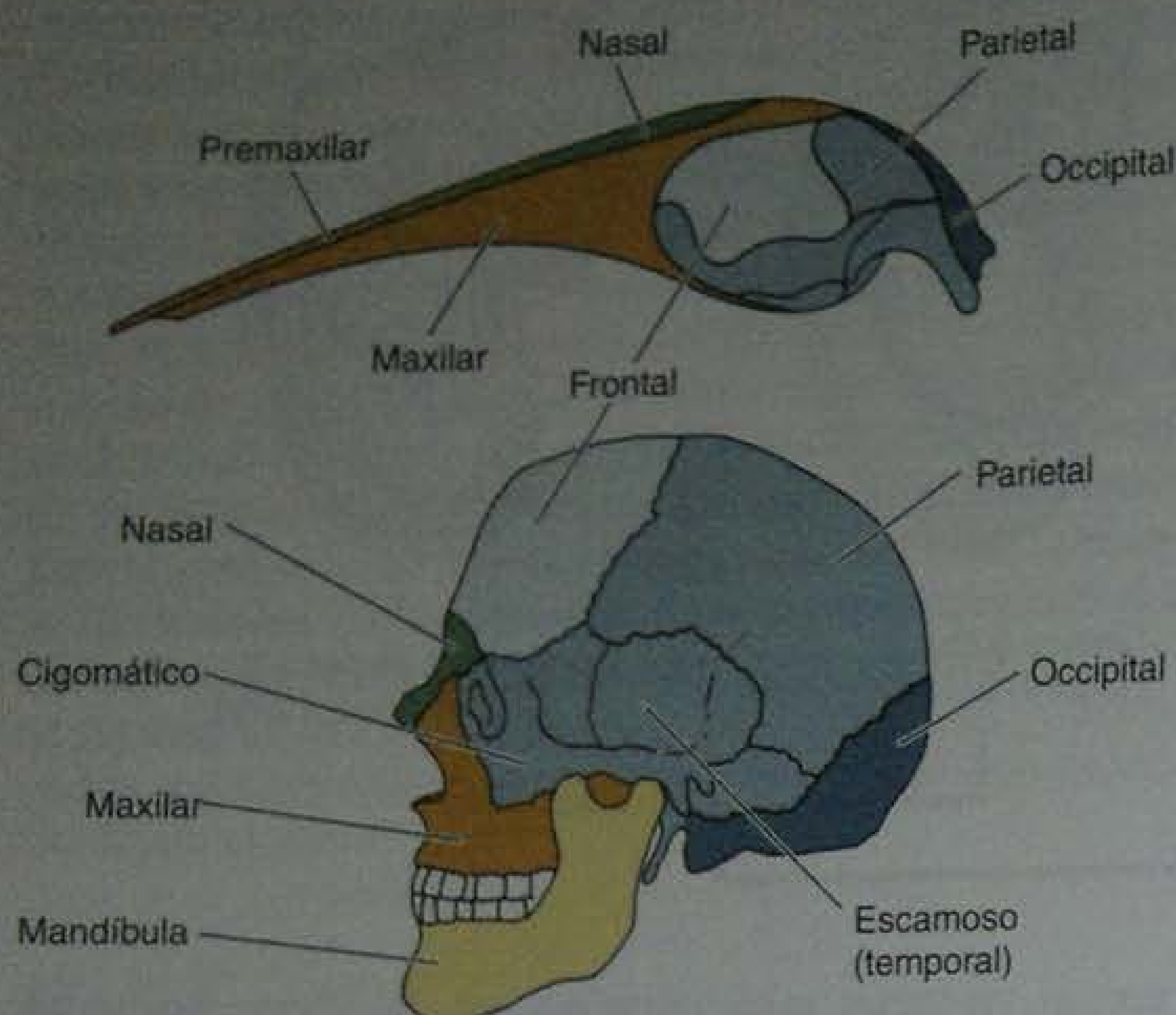


Fig. 23-19. Crecimiento alométrico en la cabeza de la ballena. Un cráneo humano adulto se muestra para comparación. La mandíbula superior (maxilar) de la ballena se ha empujado hacia adelante, haciendo que la nariz se mueva a la parte superior del cráneo. No se muestra la mandíbula (o maxilar inferior). (El premaxilar está presente en el feto humano temprano, pero éste se fusiona con el maxilar al final del tercer mes de la gestación. El premaxilar humano fue descubierto por Goethe, entre otros, en 1786.) (Según Slijper 1962.)

tos llevan a que el dedo central del caballo crezca a una velocidad 1,4 veces mayor que los dedos laterales (Wolpert 1983). Esto significa que a medida que el caballo aumentó de tamaño durante la evolución, esta diferencia regional hizo que el caballo de cinco dedos se convirtiese en un caballo de un dedo. Un ejemplo particularmente espectacular de alometría en la evolución viene del desarrollo del cráneo. En los embriones de ballena muy jóvenes (4 a 5 mm), la nariz está en la posición usual de los mamíferos. Sin embargo, el crecimiento enorme del maxilar y del premaxilar (mandíbula superior) empuja sobre el hueso frontal forzando a la nariz hacia la parte superior del cráneo (fig. 23-19). Esta nueva posición de la nariz (agujero de soplido) le permite a la ballena tener un aparato mandibular más grande y altamente especializado, y respirar mientras se encuentra paralela a la superficie del agua (Slijper 1962).

La alometría también puede generar novedades evolutivas mediante pequeños cambios que se incrementan y que, finalmente, cruzan algún umbral de desarrollo (a veces denominado punto de bifurcación). Un cambio en la cantidad finalmente se convierte en un cambio en la calidad cuando se cruza tal umbral. Se ha postulado que este tipo de mecanismo produjo el revestimiento de pelaje de las bolsas externas de las mejillas de la ardilla de bolsillo (ratón de bolsillo) y de las ratas canguro que viven en los desiertos. Estas bolsas abdominales externas difieren de las internas en que están revestidas de pelaje y que no tienen conexión interna con la boca. Ellas le permiten a estos animales almacenar semillas sin correr el riesgo de la desecación. Brylski y Hall (1988) han disecado las cabezas de los embriones de las ardillas de bolsillo y de las ratas canguro, y han estudiado el modo por el cual se construye la bolsa de la mejilla. Cuando los datos de estos animales fueron comparados con los de animales que forman bolsas internas de la mejilla (como los hámsters), los investigadores hallaron que las bolsas se formaban de una forma muy semejante. En ambos casos, las bolsas se forman dentro de las mejillas embrionarias mediante la evaginación del epitelio de la mejilla (bucal) hacia el mesénquima facial. En los animales con bolsas de la mejilla interna, estas evaginaciones se encuentran dentro de la mejilla. Sin embargo, en los animales que forman bolsas externas, la elongación de los hocicos detiene la evaginación hacia la región del labio. A medida que el epitelio del labio se estira de la cavidad oral produce como consecuencia la evaginación. Lo que había sido interno se convierte en externo. El revestimiento de pelaje probablemente es derivado de las bolsas externas que entran en contacto con el mesénquima dérmico, que puede inducir la formación de pelo en el epitelio (véase cap. 12).

La transición desde una bolsa interna a externa es uno de los umbrales. La localización de las evaginaciones –de manera anterior o posterior– determina si la bolsa es interna o externa. No hay un "estadio transicional" que exhiba dos aberturas, una interna y una externa.* Se puede imaginar que esta externalización ocurrió por una mutación casual o por la concatenación de alelos que desplazaron la evaginación hacia una localización levemente más anterior. Tal característica puede ser seleccionada para los ambientes desérticos, donde la desecación es un riesgo constante. Como Van Valen reflejó en 1976, la evolución puede ser definida como "el control del desarrollo por la ecología".

Duplicación y divergencia

La modularidad también permite la duplicación y la divergencia. La parte de duplicación de este proceso permite la formación de estructuras redundantes, y la divergencia permite que estas estructuras asuman nuevos papeles. Una de las copias puede mantener el papel ori-

* La ausencia de tales formas transicionales es citada con frecuencia por los creacionistas como evidencia contra la evolución. Por ejemplo, en la transición desde reptiles a mamíferos, tres de los huesos de la mandíbula del reptil se convierten en el estribo y el martillo, dejando solo un hueso (el dentario) en la mandíbula inferior (véase cap. 1 y a continuación). Gish (1973), un creacionista, decía que ésta es una situación imposible, debido a que no se ha descubierto ningún fósil que muestre dos o tres huesos mandibulares y dos o tres huesecillos del oído. Tal animal, afirmó, debería haber arrastrado su mandíbula sobre la tierra. Sin embargo, tal forma transicional específica (y hay cerca de una docena de formas transicionales documentadas entre los cráneos de reptiles y de mamíferos) no necesita haber existido. Hopson (1966) ha demostrado, sobre el terreno embriológico, cómo el hueso de la mandíbula puede haberse dividido y utilizado para diferentes funciones, y Romer (1970) ha hallado fósiles de reptiles en los cuales la nueva articulación mandibular ya era funcional mientras que los huesos antiguos estaban volviéndose sin uso. Hay varias especies de reptiles terápsidos que tuvieron dos articulaciones mandibulares; con el estribo llevado en estrecha proximidad con la porción superior del hueso cuadrado (que llegaría a ser el yunque).

ginal mientras que las otras son libres de mutar y de divergencia funcional. Este proceso puede suceder en numerosos niveles. Los genes Hox, los genes de la familia TGF-β, los genes de la familia MyoD, los genes *Distal-less* y los genes de la globina, cada uno de ellos probablemente comenzó como un único gen que fue duplicado varias veces. Después de cada duplicación, las mutaciones causaron divergencia que les dieron a los miembros de cada familia nuevas funciones. Por lo tanto, Morange (2001, pág. 33) concluyó: "La diferencia más importante entre el genoma de una mosca de la fruta y el del humano por esta razón no es que el humano tenga nuevos genes sino que donde la mosca tiene solamente un gen, nuestra especie tiene familias multigénicas". A nivel de tejido, se puede ver la duplicación y la divergencia en los somitas que dan origen a las vértebras cervicales, torácicas y lumbares.

Co-opción (reclutamiento)

Ninguna estructura está destinada para un único propósito particular. Un lápiz puede ser utilizado para escribir, pero también puede ser usado como un escarbadientes, como una daga, como perforador o como un palillo de tambor. A nivel molecular, el gen *engrailed* es utilizado para la segmentación en el embrión de *Drosophila*, es utilizado posteriormente para especificar sus neuronas y es utilizado en los estadios larvales para proporcionar un eje anteroposterior a los discos imaginales. De modo semejante, una proteína que funciona como una enolasa o la enzima alcohol deshidrogenasa en el hígado pueden funcionar como una proteína cristalina estructural en el cristalino (Piatigorsky y Wistow 1991). En otras palabras, las unidades preexistentes pueden ser **co-optadas** (reclutadas; reasignadas) para nuevas funciones. A veces, vías de señalización completas son co-optadas desde un sistema a otro. Por ejemplo, la vía por la cual la proteína Hedgehog induce a la proteína Engrailed a establecer el patrón y extender el ala del insecto es luego utilizada dentro de las hojas del ala para producir las manchas oculares de las mariposas y de las polillas. Distal-less, otra proteína utilizada para extender el disco imaginal del ala, es utilizada posteriormente para formar el centro de tales manchas oculares (fig. 23-20).

La co-opción también puede observarse a nivel morfológico. Las alas han evolucionado tres veces durante la evolución de los vertebrados y, en cada caso, diferentes estructuras de las extremidades anteriores fueron modificadas para una función completamente nueva: una estructura originalmente utilizada para caminar ha sido reclutada hacia una estructura apropiada para volar. Un caso famoso de co-opción es el uso de partes de la mandíbula embrionaria en la creación del oído medio de mamíferos, como se describió en el capítulo 1 (véase fig. 1-14; Gould 1990). En primer lugar, los arcos branquiales de los peces sin mandíbula se convierten en las mandíbulas de sus descendientes; luego, millones de años más tarde, los elementos superiores del hueso mandibular del reptil se convierten en los huesos del martillo y del estribo del oído medio de los mamíferos (fig. 23-21).

Generación de novedades evolutivas

En 1940, Richard Goldschmidt escribió que la acumulación de pequeños cambios genéticos no era suficiente para generar evolutivamente estructuras novedosas (originales) como la cresta neural, los dientes, el caparazón de la tortuga, las plumas o los cnidocistos. Él afirmó que tal evolución debería producirse solamente a través de cambios heredables en los genes que regulaban el desarrollo. Por años, aquellos genes se mantuvieron desconocidos. En 1977, la idea de que el cambio dentro de los genes reguladores era crítica para la evolución fue extendida por

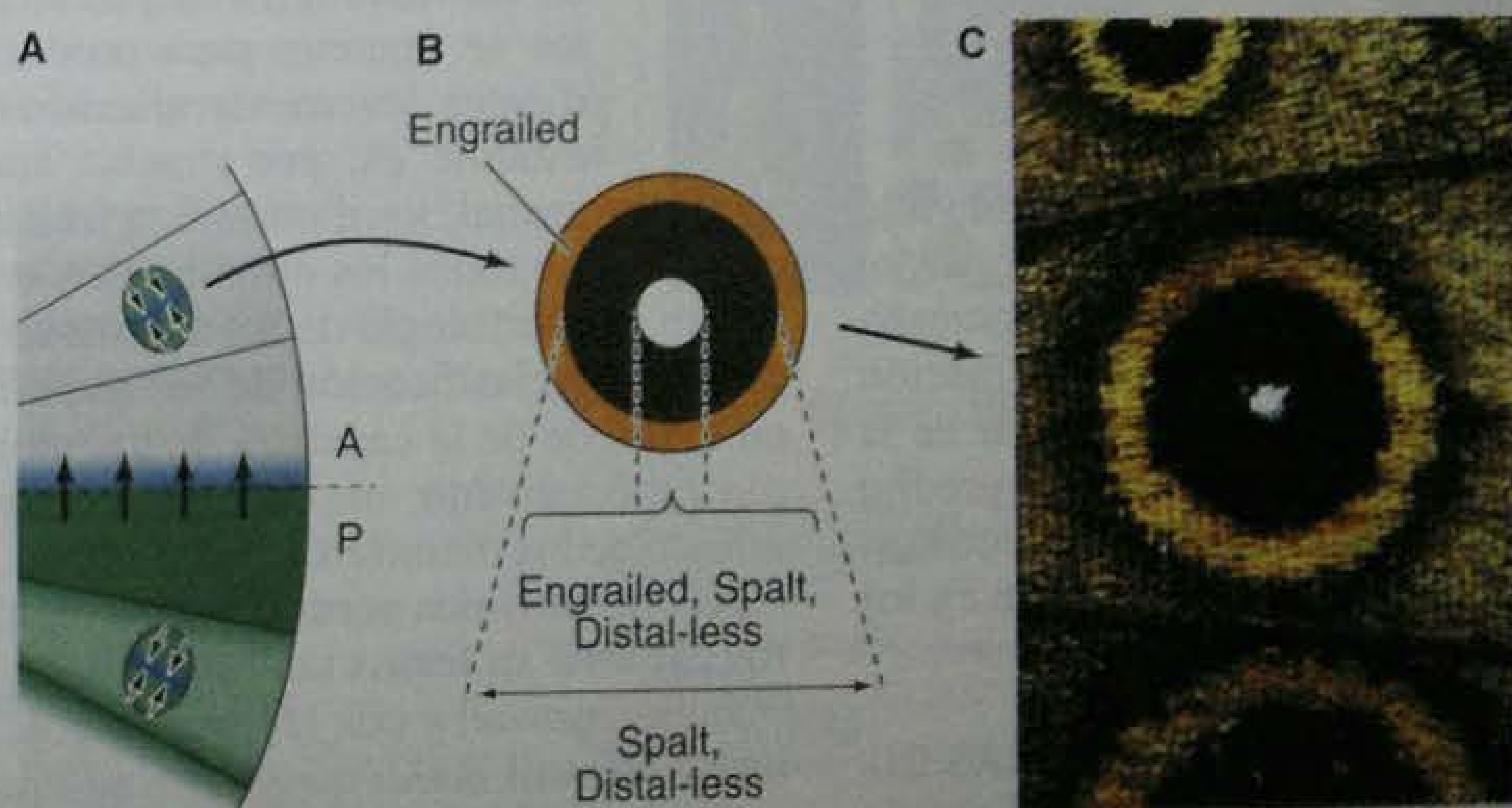


Fig. 23-20. Vía de transducción de la señal de la co-opción (reclutamiento) en la formación de las manchas oculares de la mariposa. **A.** La interacción entre Hedgehog (verde) y Engrailed (azul) se ve primero en el blastodermo del insecto y luego es modificada durante la creación de una nueva estructura, el ala. En el disco del ala, Hedgehog en el compartimento posterior induce la expresión de Engrailed en las células inmediatamente anteriores al límite anterior/posterior. Dentro del ala de la mariposa, la misma vía es utilizada para crear la mancha ocular. En la región posterior del ala, Hedgehog es regulado en menos localmente de modo tal que la re-expresión puede inducir a Engrailed. **B, C.** En *Bicyclus anynana* (véanse figs. 22-8 y 22-9), la señal para producir las manchas oculares también activa a varios genes que fueron utilizados para la formación del ala. La porción central blanca de la mancha ocular expresa Engrailed, Spalt y Distal-less. Las células que se convertirán en la región negra que rodea al centro expresan Spalt y Distal-less. El anillo periférico de las células que generarán el pigmento naranja expresa solamente Engrailed. (Según Keys y col. 1999 y Brunetti y col. 2001; fotografía cortesía de S. B. Carroll y S. Paddock.)

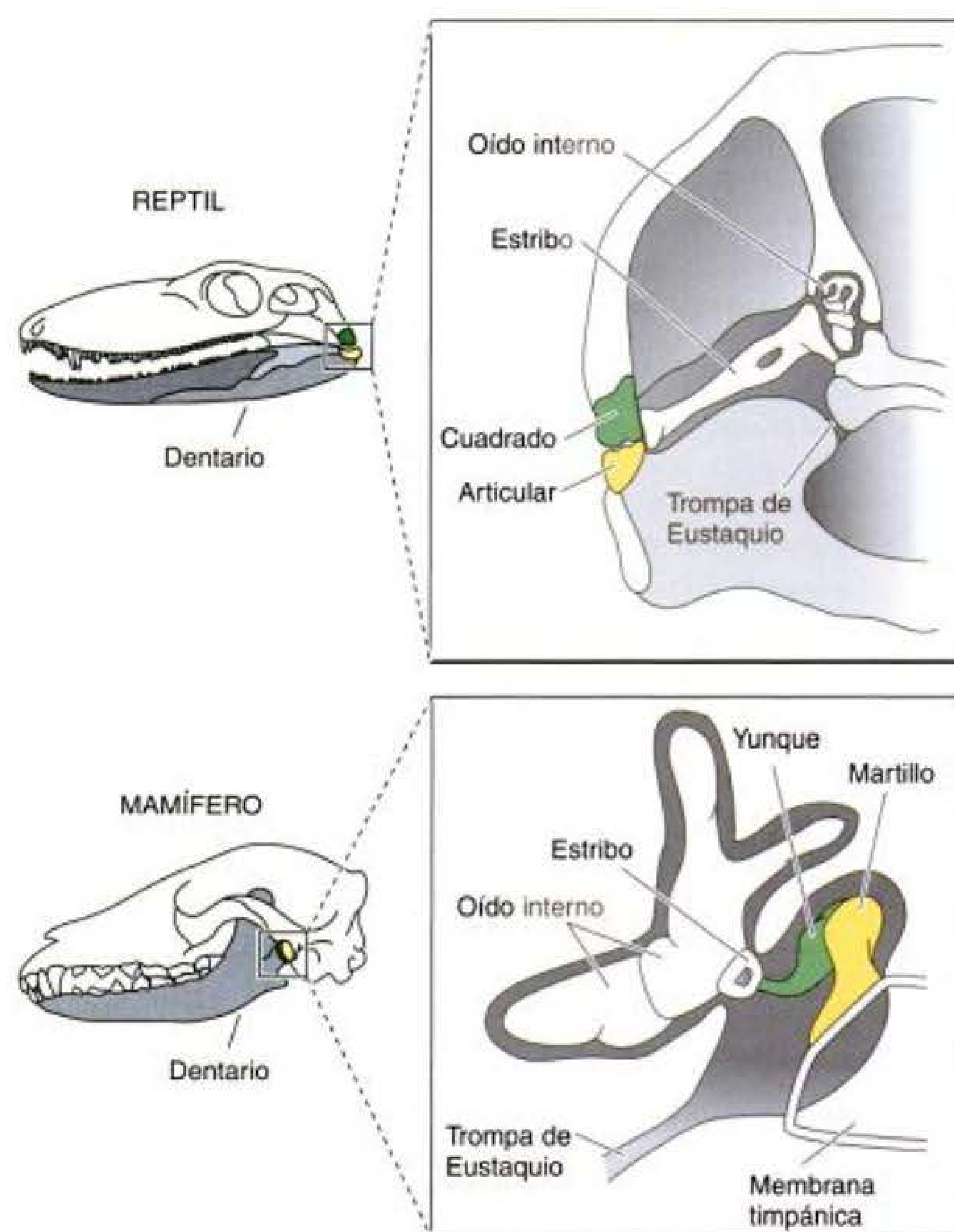


Fig. 23-21. Evolución de los huesos del oído medio de los mamíferos desde la mandíbula del reptil. Los huesos cuadrado y articular de los reptiles fueron parte de la mandíbula inferior (maxilar inferior). El sonido pudo ser transmitido desde estos huesos hacia el estribo de mayor tamaño. Cuando el hueso dentario creció y asumió las funciones mandibulares de estos dos huesos, el hueso articular se convirtió en el martillo y el hueso cuadrado llegó a ser el yunque. (Según Romer 1949.)

François Jacob, el ganador del premio Nobel que ayudó a establecer el modelo de regulación génica del operón. En primer lugar, Jacob dijo que la evolución funcionaba con lo que tenía: ésta actuaba mediante la combinación de nuevos modos de las partes existentes, en lugar de la creación de nuevas partes. En segundo lugar, el predijo que tales "ajustes" ocurrieron en los genes que construyeron el embrión, no en los genes que funcionaban en los adultos (Jacob 1977).

CÓMO LOS PATOS OBTUVIERON SUS MEMBRANAS INTERDIGITALES. En la década de 1990, los científicos de todo el mundo habían confirmado este modelo de desarrollo de la generación de estructuras novedosas. Algunas de estas investigaciones han sido referidas en capítulos anteriores. Por ejemplo, en el capítulo 16, la diferencia entre la pata del pato con membranas interdigitales y la pata del pollo con garras fue atribuida a la expresión de *gremlin* en el espacio interdigital del pato. La proteína Gremlin es un inhibidor de BMP, y se piensa que la señal de BMP es responsable de la apoptosis en la región interdigital (fig. 23-22; Merino y col. 1999).

CÓMO LAS AVES OBTUVIERON SUS PLUMAS. Las plumas de las aves constituyen un excelente ejemplo de novedades evolutivas. Las plumas evolucionaron solamente entre los reptiles y actualmente se las encuentra solamente en las aves, que descendieron de este grupo. Aunque se ha pensado durante mucho tiempo que las plumas surgieron como una modificación de las escamas de los reptiles (véase Maderson 1972; Maderson y Alibardi 2000; Prum y col. 1999), el mecanismo que produce las plumas no ha podido ser revelado. Harris y col. (2002) han proporcionado un mecanismo de desarrollo para la evolución de la pluma y demostraron que la pluma muy probablemente evolucionó desde la escama del arcosaurio (dinosaurio/ancestro de las aves) a través de una alteración de los patrones de expresión de las proteínas Sonic hedgehog y BMP2.

Las escamas y las plumas empiezan el mismo camino, con BMP2 y Shh expresados en dominios separados. Sin embargo, en la pluma, ambos dominios de expresión se desplazan hacia la región distal del apéndice. Luego, este patrón específico de la pluma se repite serialmente alrededor del eje proximodistal. La interacción entre BMP2 y Shh hace que cada una de estas regiones forme su propio eje, las lengüetas de la pluma (fig. 23-23). Además, cuando este patrón repetido de manera serial de Shh o BMP fue modificado experimentalmente, el patrón de la pluma fue modificado de un modo predecible (Harris y col. 2002; Yu y col. 2002).

CÓMO LOS MAMÍFEROS CAMBIARON SUS MOLARES. Stephen J. Gould (1989) bromeaba que los paleontólogos creían que la evolución de los mamíferos se produce cuando dos dientes se aparean para producir dientes descendientes levemente alterados. Debido a que el esmalte es, por mucho, más perdurable que el hueso normal, los dientes con frecuencia se mantienen después que todos los otros huesos se descomponen. En efecto, la morfología de los dientes ha sido crítica para la ecología y clasificación de los mamíferos. Los cambios en el patrón de la caperuza de los molares son vistos como especialmente importantes en permitir el desplazamiento de los mamíferos hacia nuevos nichos ecológicos. ¿Qué mecanismos permiten a los molares de los mamíferos cambiar su forma tan rápidamente?

Jukka Jernvall y col. (Jernvall y col. 2002; Salazar-Ciudad y Jernvall 2002) basándose en una aproximación por computadora fueron los precursores en producir el fenotipo utilizando los Sistemas de Información Geográfica (GIS, del inglés, *Geographic Information Systems*), la misma tecnología que utilizan los ecologistas para mapear la vegetación de las laderas. Utilizaron esta tecnología para mapear los patrones de expresión génica en los esbozos dentarios incipientes (literalmente transformaron una montaña en un molar). Sus estudios han demostrado que los patrones de expresión génica pronostican la localización exacta de las caperuzas de los dientes. También demostraron que las diferencias entre los molares de

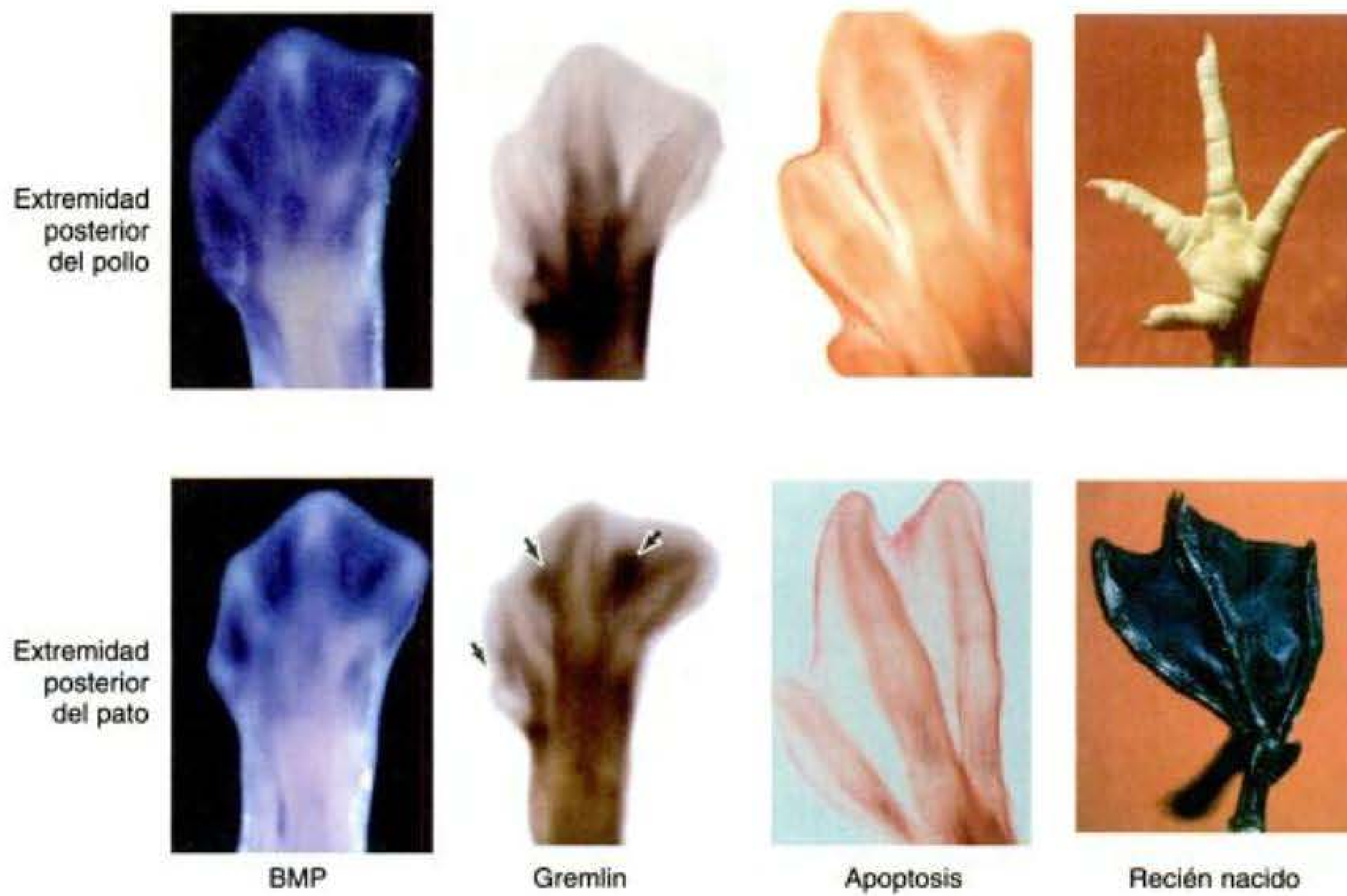


Fig. 23-22. Regulación de la apoptosis de la extremidad del pollo por BMP. Se muestran autópodos de patas de pollo (fila superior) y de pato (fila inferior) en estadios similares. Las hibridaciones in situ muestran que mientras que los BMP son expresados en las membranas interdigitales de las extremidades posteriores del pollo y del pato, la extremidad del pato muestra expresión de la proteína Gremlin (flechas) así como lo hace la membrana interdigital. Gremlin es un inhibidor de BMP. El patrón de muerte celular (mostrado por la acumulación de la tinción de rojo neutro) se vuelve diferente en las dos especies. (Fotografía cortesía de J. Hurle y E. Laufer.)

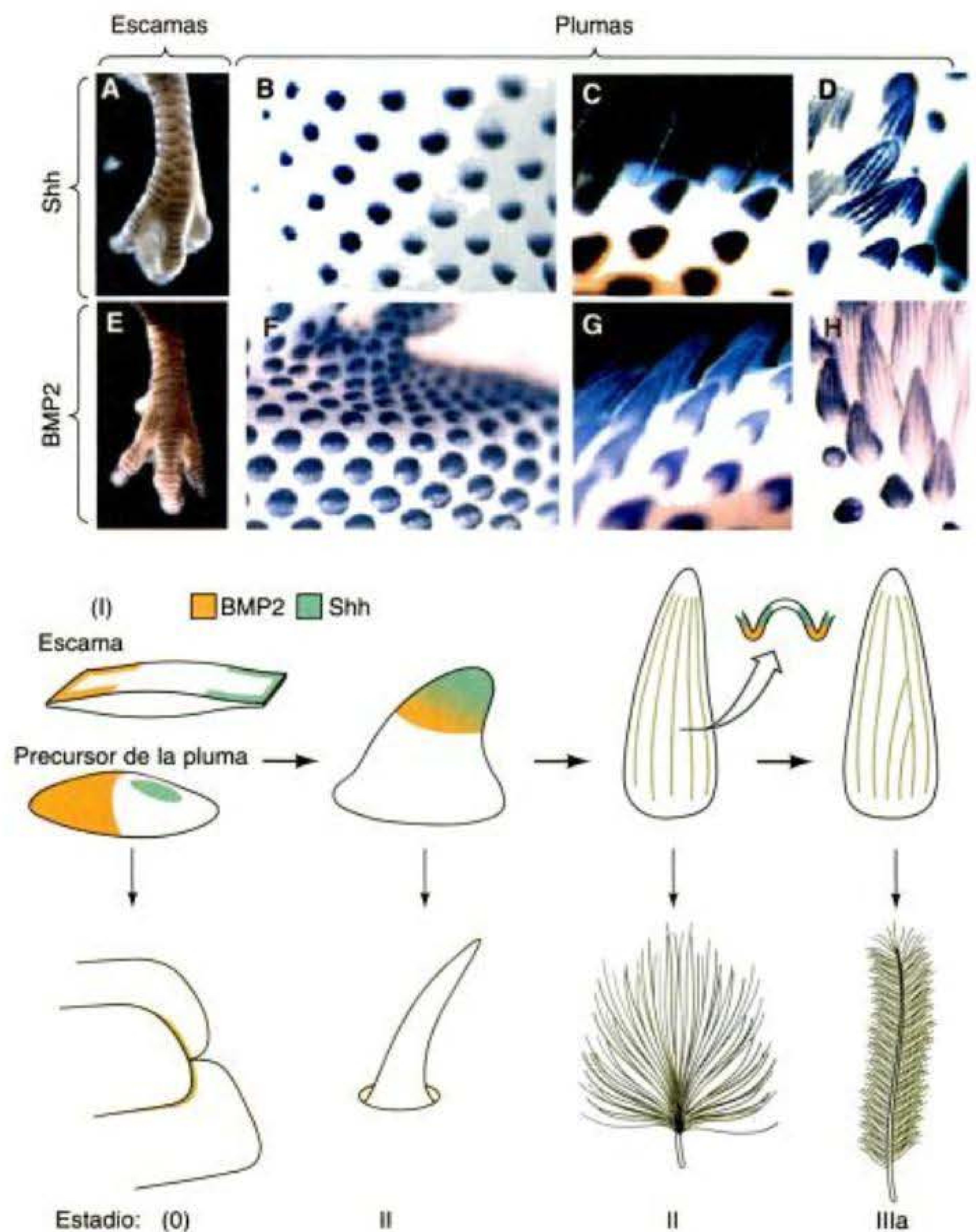


Fig. 23-23. Patrones de expresión de BMP2 y de Shh en las plumas y escamas. **A-H.** Las hibridaciones in situ en embriones in toto muestran la localización de Shh y de BMP2 en las plumas y escamas del embrión de pollo en desarrollo. **A, E.** Shh y BMP2 se ven en los extremos opuestos de la escama en desarrollo. En los esbozos de las plumas, el patrón es inicialmente el mismo que en las escamas (**B, F**) pero ambos genes se expresan en el extremo distal de la pluma en desarrollo (**C, G**) y luego forman bandas a lo largo del rudimento de la pluma (**D, H**). **I.** Modelo para la evolución de la pluma mediante cambios en el patrón de expresión de Shh y de BMP2. El estadio 0 muestra la expresión de Shh y de BMP2 en el esbozo de la escama (arriba) y en el de la pluma (abajo). El estadio I representa una pluma tubular como evolucionada desde una escama de arcosaurio. Se postula que los patrones de expresión de Shh y de BMP2 están en el extremo. El estadio 2 representa el surgimiento de una pluma ramificada evolucionada mediante cambios posteriores de los patrones de expresión de BMP2 y Shh para formar hileras a lo largo del eje proximodistal. En el estadio 3a, los cambios en la morfología de la pluma evolucionaron mediante la alteración del patrón para producir un raquis central. (Según Harris y col. 2002.)

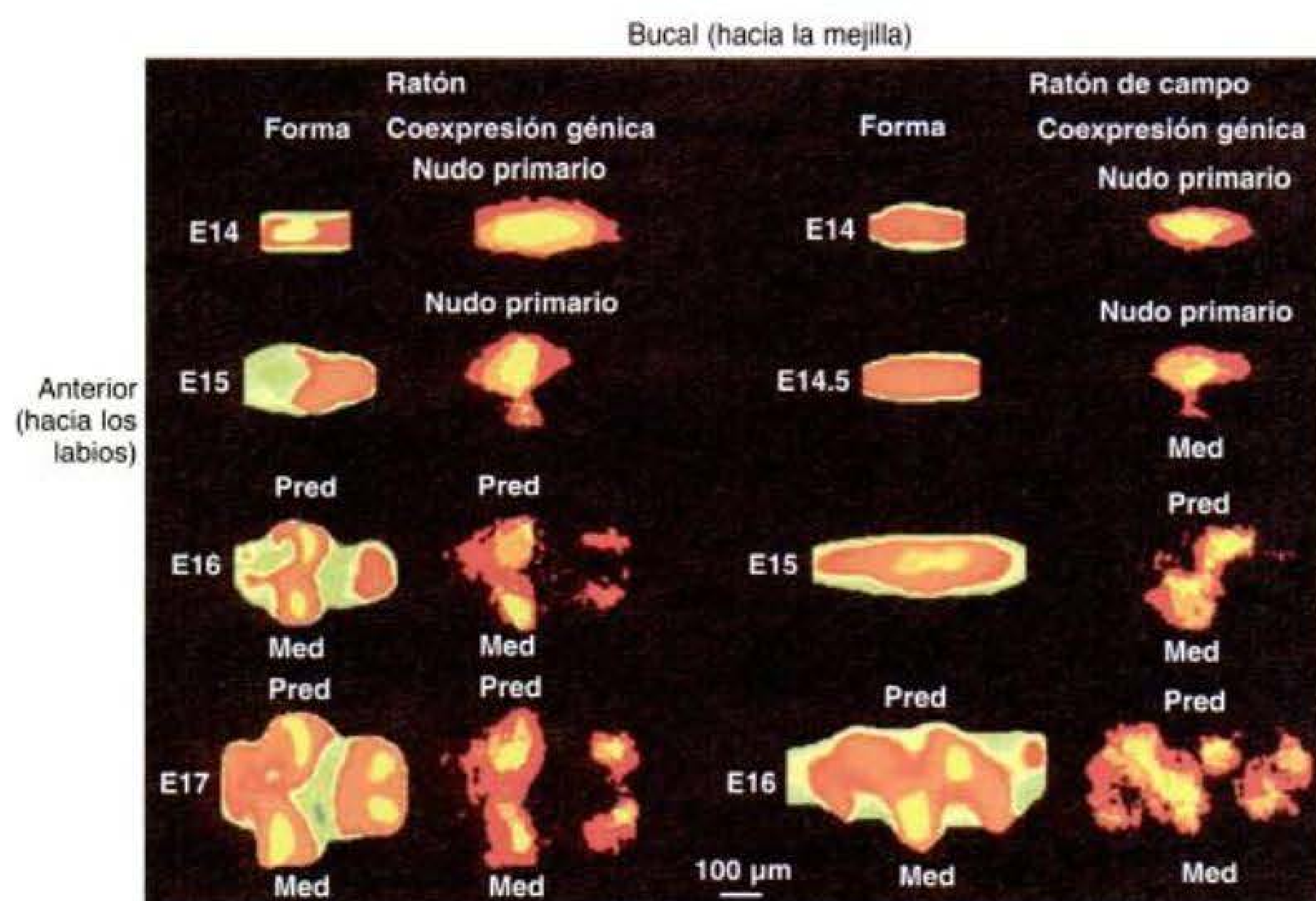


Fig. 23-24. Análisis mediante GIS de la actividad génica en la formación de la primera serie de caperuzas en los molares del ratón y del ratón de campo. Para ambas especies, GIS, que mapea la forma del molar, se muestra sobre la izquierda y la expresión de *fgf4* y *shh* (dos genes expresados desde el nudo del esmalte) se muestran sobre la derecha. El patrón de expresión génica en el día embrionario 15 predice la formación de nuevas caperuzas vistas en el día 16; el patrón de expresión génica del día 16 predice la formación de caperuzas en aquellas áreas en el día 17. Del mismo modo, en el molar del ratón de campo, cuyas cúspides son diagonales entre sí, el patrón de expresión génica predice la formación de la caperuza. (Según Jernvall y col. 2000; fotografía cortesía de J. Jernvall.)

los ratones y de los ratones de campo* son predichas con base en las diferencias en los patrones de expresión génica (fig. 23-24).

A continuación, Salazar-Ciudad y Jernvall propusieron un modelo matemático de reacción-difusión (véase cap. 1) que debería explicar las diferencias en la expresión génica entre estas dos especies. Los cambios pequeños en una red génica, que funciona nuevamente a través de interacciones de las proteínas BMP y Shh, fueron decisivos. Shh y FGF (producidos por los centros de señalización del nudo del esmalte) inhiben la producción de BMP, mientras que la producción de BMP estimula la producción de más BMP y la síntesis de sus inhibidores, de FGF y de las proteínas Shh. Esto debería crear regiones de activadores (BMP) que bloquearan la proliferación epitelial y regiones de inhibidores (FGF, Shh) que bloquean la síntesis de BMP y estimulan de manera independiente la proliferación mesenquimática. El resultado es un patrón de actividad génica que cambia a medida que cambia la forma del diente y viceversa (fig. 23-25).

Utilizando este modelo, las grandes diferencias entre los molares del ratón y los del ratón de campo pueden generarse por pequeños cambios en las constantes de unión y en las velocidades de difusión de las proteínas BMP y Shh. Un pequeño incremento en la velocidad de difusión de BMP4 y una constante de unión más fuerte de su inhibidor es suficiente para cambiar el patrón de crecimiento del diente del ratón de campo hacia el del ratón. Por lo tanto, los grandes cambios morfológicos pueden resultar de cambios muy pequeños en las condiciones iniciales. Otra conclusión es que todas las células pueden comenzar con la misma serie de instrucciones básicas; las instrucciones específicas surgen a medida que las células interactúan. Este modelo matemático también predice que algunos tipos de dientes hayan evolucionado, muy probablemente, en ciertos sentidos y no en otros, y que ciertas formas son probablemente más evolucionadas que otras. Estas predicciones conforman lo que los paleontólogos han concluido sobre la evolución de los mamíferos.*

CÓMO LOS PECES OBTUVIERON SUS MANDÍBULAS. Cuando comenzó a evolucionar la cara de los vertebrados, ésta no tenía mandíbulas. Estos vertebrados iniciales eran similares a los ciclostomos de la actualidad: las lampreas y los hagfish. Ellos tienen un esqueleto cartilaginoso completo y un cráneo que no difiere en gran medida del de los vertebrados. En los gnatostomos (vertebrados mandibulados), las células de la cresta neural craneal ingresan a los arcos faríngeos, y las células de la cresta neural que migran hacia el primer arco faríngeo forman la mandíbula (mandíbula o maxilar inferior) y el proceso maxilar (techo de la boca). Una migración de células de la cresta neural tiene lugar en los ciclostomos, pero el primer arco faríngeo no forma cartílago de Meckel o el derivado mandibular de éste. En su lugar, las células de la cresta neural forman una boca redondeada sin mandíbula. Parece que se han producido dos acontecimientos principales para que este grupo de células de la cresta neural del primer arco faríngeo se convierta en una mandíbula: ellas han tenido un ambiente permisivo y han recibido una nueva serie de instrucciones.

El *ambiente permisivo* vino a través de la eliminación de una barrera. Los ciclostomos forman una placa nasohipofisaria desde la cual se desarrollan el epitelio nasal y la hipófisis (pituitaria). Esta placa epitelial forma una barrera para la migración de la célula de la cresta neural, y el único modo que tienen las células de la cresta neural

* *Nota del traductor:* los investigadores utilizaron ratones (*Mus musculus*) y ratones de campo (*Microtus rossiaemeridionalis*). Los ratones de campo también son conocidos como campañoles, ratones del huerto o ratones de pradera.

* Una de las diferencias críticas entre el modelo de Jernvall y el de Salazar-Ciudad y otros modelos de reacción-difusión es que éste permite que los parámetros cambien mientras se está desarrollando el diente. Esta suposición otorga una enorme flexibilidad al sistema en desarrollo y permite que éste cambie a velocidades relativamente rápidas durante la evolución.

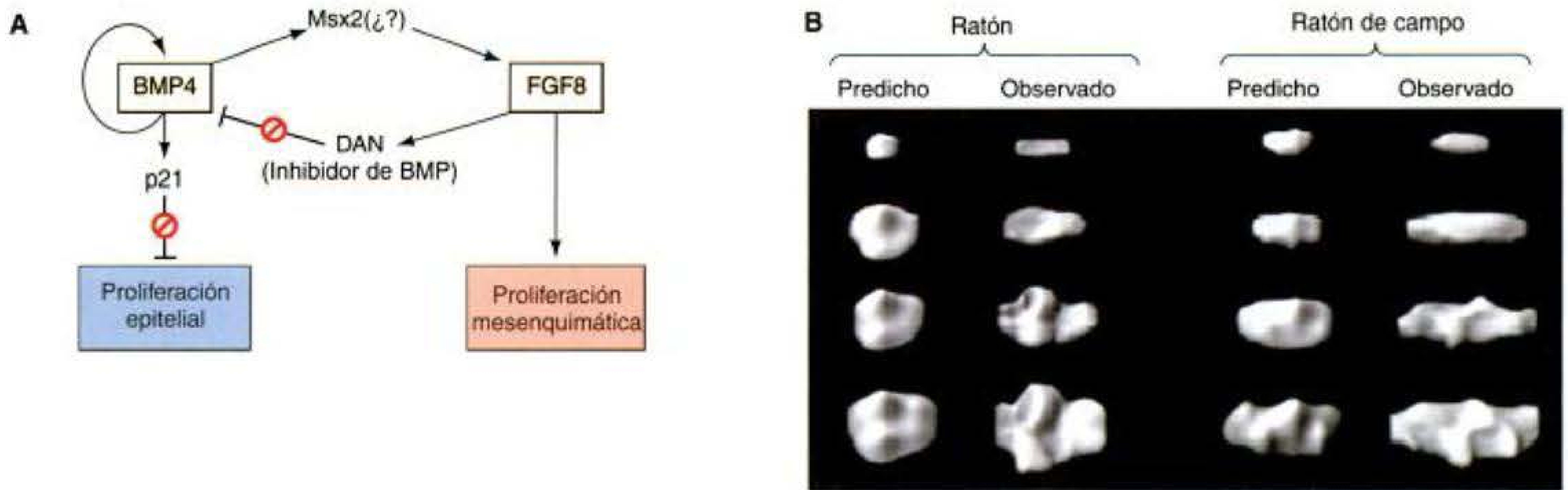


Fig. 23-25. Modelo básico para el desarrollo de la caperuza en los ratones y en los ratones de campo. **A.** Red génica derivada experimentalmente por la cual los BMP activan su propia producción así como la producción de sus inhibidores, Shh y FGF. Los FGF y Shh estimulan la proliferación celular; los BMP la inhiben. **B.** Resultados predichos y observados desde este modelo. El modelo puede generar las formas final e intermedia del desarrollo del molar en ratones y en ratones de campo, y la diferencia entre los molares del ratón y de los ratones de campo puede ser reproducida mediante leves alteraciones en el índice de difusión de BMP y la unión a inhibidores. (Según Salazar-Ciudad y Jernvall 2002; fotografías cortesía de J. Jernvall.)

de migrar hacia adelante es ir por detrás de ésta. Las células de la cresta neural, luego, forman el labio superior de la boca del ciclostomo. En los gnatostomos, la placa nasohipofisaria se ha separado en la placoda nasal y en la bolsa de Rathke, dejando un espacio entre estas estructuras a través de la cual las células de la cresta neural podían migrar. Las células que migran hacia esta región forman la mandíbula (fig. 23-26; Kuratani y col. 2001). Por lo tanto, la diferencia que permite la formación de la mandíbula podría ser una diferencia en el tiempo de separación entre los rudimentos de las placodas nasales y los rudimentos de la hipófisis. Si la separación es temprana, la mandíbula es posible. Si la separación es tardía, existe una barrera que evita la migración de la célula de la cresta neural hacia la región que debería formar la mandíbula. Tal modificación temporal puede deberse a cambios temporales leves de una interacción tisular particular (Shigetani y col. 2002).

La *nueva serie de instrucciones* proviene de un cambio en la expresión génica Hox. En las lampreas, hay expresión génica Hox en el primer arco faríngeo (Cohn 2002); en los gnathostomos, no hay tal expresión. Además, si los genes Hox son expresados ectópicamente en el primer arco faríngeo de los embriones de peces, de rana o de po-

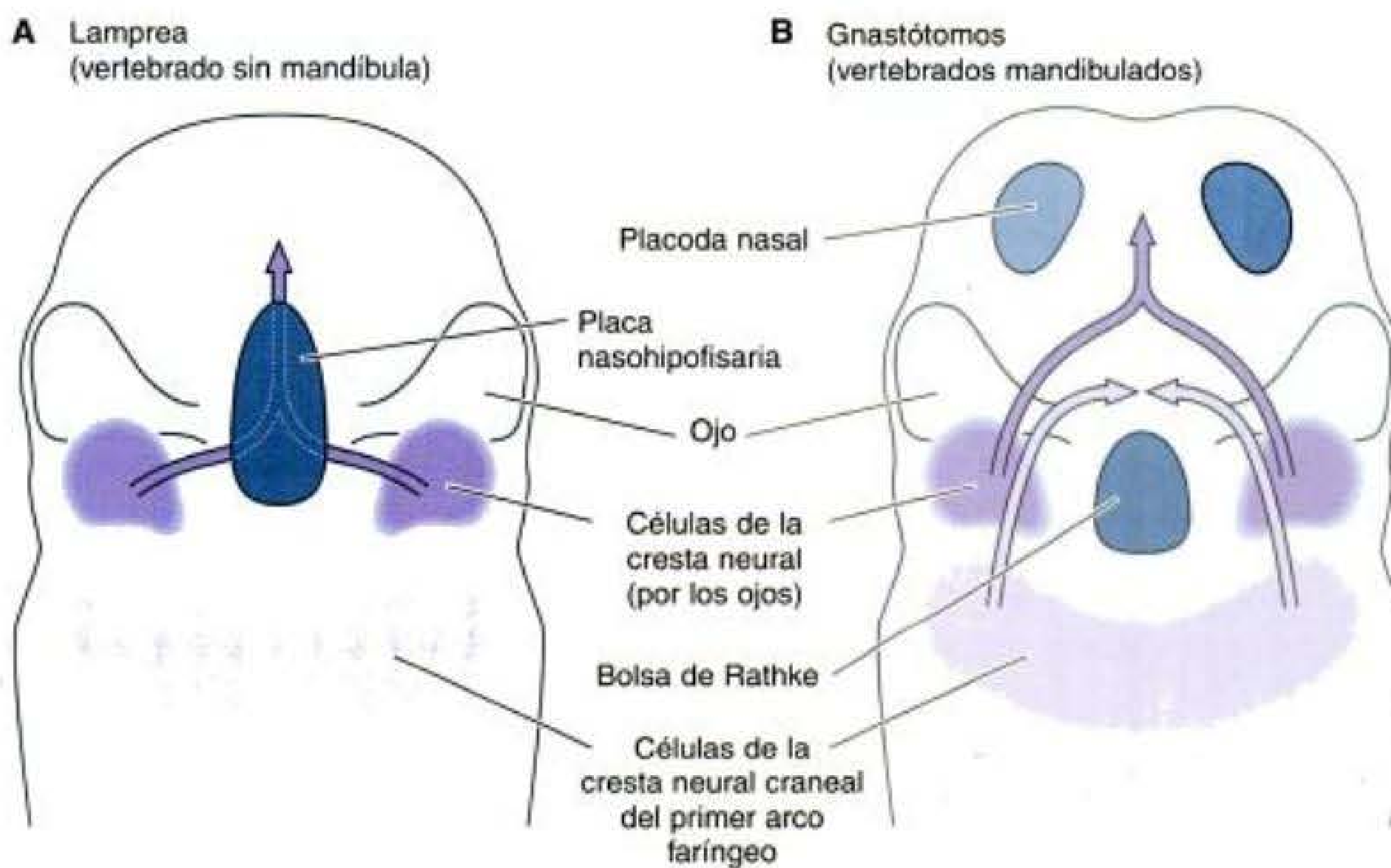


Fig. 23-26. Patrones de migración de las células de la cresta neural en lampreas y gnatóstomos. **A.** En la lamprea, el labio superior se desarrolla desde las células de la cresta neural craneal que migran rostralmente por debajo de la placa nasohipofisaria (que formará la placoda nasal y la hipófisis). **B.** En los gnatóstomos, el tejido nasohipofisario ya está separado en la bolsa de Rathke (el rudimento de la hipófisis) y la placoda nasal (olfatoria). Las células de la cresta neural craneal migran rostralmente entre estas dos estructuras para formar parte del cartílago de la mandíbula inferior (maxilar inferior). La mandíbula superior (maxilar superior) se forma desde las células de la cresta neural craneal que migran rostralmente y se fusionan anteriores a la bolsa de Rathke. (Según Kuratani y col. 2001.)

llo, el desarrollo de la mandíbula es severamente inhibido (Alexandre y col. 1996; Pasqualetti y col. 2000; Grammatopoulos y col. 2000). (En efecto, las estructuras parecen recordar a los ancestrales arcos hiodeos). Por lo tanto, los genes Hox parecen evitar que las células de la cresta neural del primer arco faríngeo formen mandíbulas. Cuando se inhiben los genes Hox, se hace viable una nueva serie de instrucciones genéticas.

Restricciones del desarrollo

Hay solo cerca de tres docenas de filos animales que representan los principales planes corporales del reino animal. Fácilmente se pueden imaginar a otros tipos de planes corporales e imaginar a animales que no existieron (los escritores de ciencia ficción lo hacen todo el tiempo). ¿Por qué no se han encontrado más planes corporales entre los animales? Para responder esto, se consideran las restricciones (o limitaciones, *constraints*) que el desarrollo impone sobre la evolución.

El número y las formas posibles de fenotipos que pueden ser creados están limitados por las interacciones que son posibles entre las moléculas.* Estas interacciones moleculares también permiten que los cambios se produzcan en ciertas direcciones más fácilmente que en otras. Colectivamente, las restricciones sobre la producción del fenotipo son denominadas **restricciones del desarrollo.** Estas restricciones sobre la evolución caen en tres categorías principales: físicas, morfogenéticas y filéticas.

SITIO WEB 23.10 **¿Por qué no hay un nuevo filo animal? (Why are there no new animal phyla?).** Parece que las tres docenas, o casi, de los filos conocidos fueron creados cerca de 500 millones de años atrás. Ésta podría ser la razón por la que no ha surgido un nuevo filo desde el Cámbrico tardío. ¿Cuál es la evidencia para la formación inicial de los filos y por la que algunos planes corporales no fueron estrenados?

Restricciones físicas

Hay restricciones físicas inmutables sobre la construcción de un organismo. Las leyes de la difusión, de la hidráulica y de sostén físico permiten que solamente se produzcan ciertos mecanismos de desarrollo. No se puede tener un vertebrado sobre apéndices con ruedas (del tipo que Dorothy dijo en Oz) debido a que la sangre no puede circular hacia órganos en rotación; esta posibilidad entera de evolución ha sido cerrada. De modo semejante, los parámetros estructurales y la dinámica de fluidos impiden la existencia de mosquitos de 150 cm de altura.

La elasticidad y fuerza de tensión son también restricciones físicas. En el espermatozoide de *Drosophila*, por ejemplo, el tipo de tubulina que puede ser utilizado en el axonema está restringido por la necesidad de ciertas propiedades físicas en los flagelos excepcionalmente largos (Nielsen y Raff 2002). Los seis comportamientos celulares utilizados en morfogénesis (división celular, crecimiento, cambio de forma, migración, muerte y secreción de matriz) están limitados por parámetros físicos y, de este modo, proporcionan límites sobre los cuales las estructuras animales pueden formarse. Las interacciones entre las diferentes series de tejidos involucran la coordinación de los comportamientos de las láminas, cordones y tubos celulares en un número limitado de caminos (Larsen 1992).

Restricciones morfogenéticas

Las reglas para la construcción morfogenética también limitan los fenotipos posibles (Oster y col. 1988). Bateson (1894) y Alberch (1989) observaron que cuando los organismos se apartan de su desarrollo normal, lo hacen solamente en un número limitado de caminos. Algunos de los mejores ejemplos de estos tipos de restricciones vienen desde el análisis de la formación de la extremidad en los vertebrados. Holder (1983) señaló que aunque hubo muchas modificaciones de la extremidad de los vertebrados en cerca de 300 millones de años, algunas (como un dígito medio más corto que los dígitos de alrededor) no son halladas. Además, los análisis de las poblaciones naturales sugieren que hay un número relativamente pequeño de caminos en los cuales se pueden producir los cambios en las extremidades (Wake y Larson 1987). Si una extremidad más larga es favorable en un ambiente dado, el húmero puede volverse más alargado, pero nunca se verán dos húmeros más pequeños unidos en serie, aunque sea posible imaginar las ventajas selectivas que tal organización podría tener. Esta observación sugiere un esquema de construcción de la extremidad que sigue ciertas reglas.

Las reglas que gobiernan la arquitectura de la extremidad pueden ser las reglas del modelo de reacción-difusión (Newman y Frisch 1979; Miura y Shiota 2000a,b). Oster y col. (1988) hallaron que el modelo de reacción-difusión puede explicar las morfologías conocidas de la extremidad y puede explicar por qué se impiden otras morfologías. Las ecuaciones de reacción-difusión predijeron las sucesiones observadas del desarrollo óseo desde el estilópodo (húmero/fémur) al zeugópodo (cúbito-radio/tibia-peroné) al autópodo (mano/pie). Si la morfología de la extremidad es, de hecho, determinada por el mecanismo de reacción-difusión, las características espaciales que no pueden ser generadas por las cinéticas de la reacción-difusión no se producirán.

La evidencia que apoya este modelo matemático viene de las manipulaciones experimentales, la anatomía comparada y la biología celular. Cuando un esbozo de extremidad de axolotl es tratado con la droga antimitótica colchicina, se reduce el número de células en el esbozo de la extremidad. En estas extremidades experimentales no hay solo una reducción en el número de dígitos, sino una

* G. W. Leibniz, probablemente el filósofo que más ha influenciado a Darwin, observó que la existencia debe ser limitada no solo a lo que es posible sino a lo que puede *componer;* esto es, mientras que numerosas cosas pueden llegar a existir, solamente las que son mutuamente compatibles en realidad existirán (véase Lovejoy 1964). Entonces, aunque muchos cambios del desarrollo son posibles, solamente los que pueden integrarse en el resto del organismo (o que pueden causar un cambio compensatorio en el resto del organismo) serán vistos.

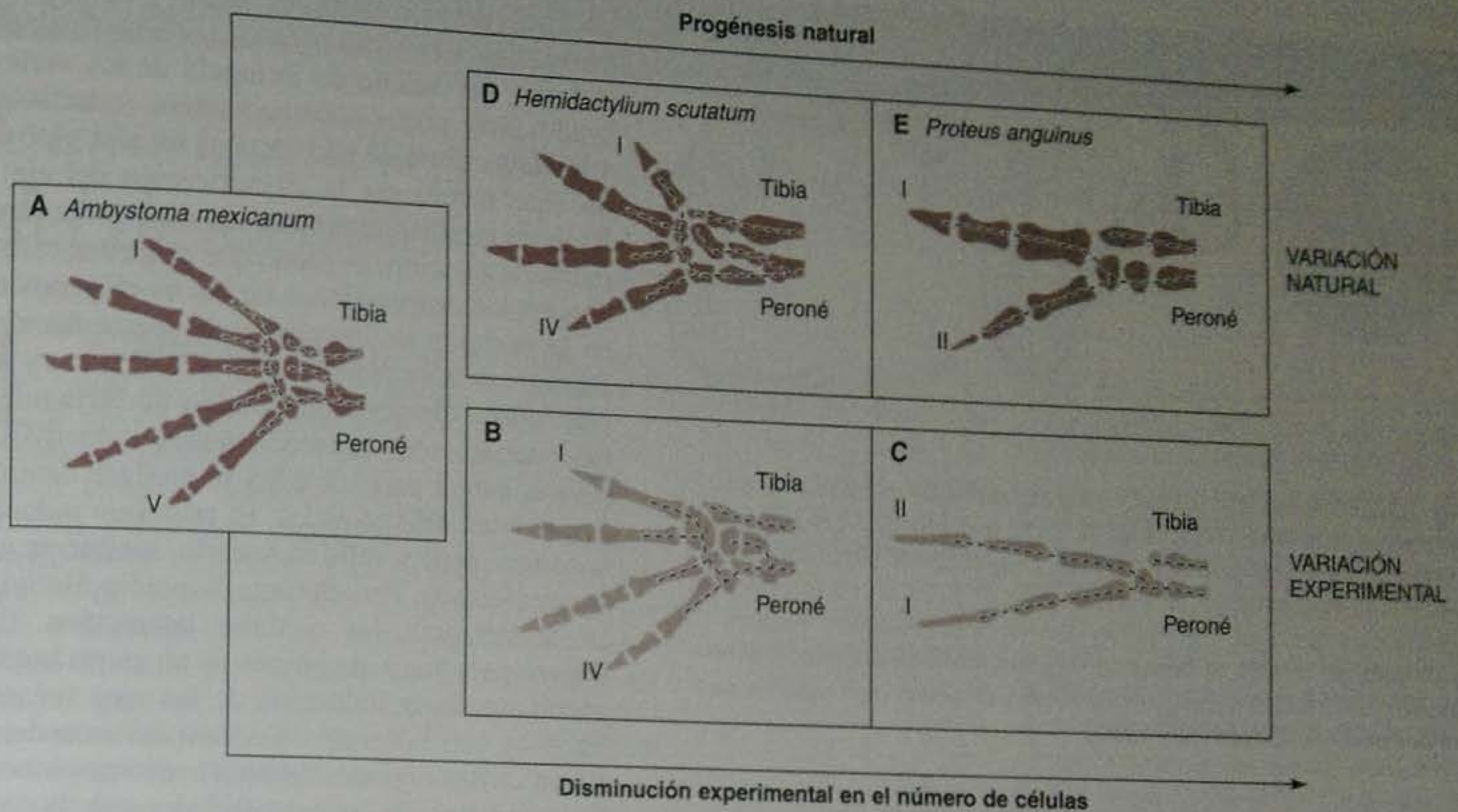


Fig. 23-27. Relación entre el número de células y el número de dígitos en las salamandras. **A.** La extremidad posterior de un axolotl (*Ambystoma mexicanum*) con sus cinco dígitos simétricos. **B, C.** Dígitos sobre la extremidad posterior del axolotl después que el esbozo de la extremidad posterior fue incubado en colchicina para reducir el número de células. **D, E.** Las extremidades posteriores de dos salamandras salvajes, cada una con un esbozo de extremidad más pequeño que la mayor parte de las otras salamandras: **D**, *Hemidactylium scutatum* y **E**, *Proteus anguinus*. Se pueden ver los paralelos entre la variación experimental y la variación natural; el común denominador son los números de células reducidos en los esbozos de las extremidades. (Según Oster y col. 1988.)

pérdida de ciertos dígitos en un cierto orden, como se predijo por el modelo matemático y por las morfologías "prohibidas". Además, estas pérdidas de dígitos específicos producen extremidades muy similares a las de ciertas salamandras cuyas extremidades se desarrollan desde un esbozo de extremidad particularmente pequeño (fig. 23-27; Alberch y Gale 1983; 1985).

Restricciones filéticas

Las restricciones filéticas sobre la evolución de nuevas estructuras son restricciones históricas basadas en la genética del desarrollo de un organismo (Gould y Lewontin 1979). Una vez que una estructura llega a ser generada por interacciones inductivas, es difícil volver a comenzar. La notocorda, por ejemplo, que es funcional en los protocordados adultos, como los anfioxos (Berrill 1987), es considerada vestigial en los vertebrados adultos. Aunque ésta es transitoriamente necesaria en el embrión de vertebrado, donde especifica el tubo neural. Del mismo modo, Waddington (1938) observó que, aunque el riñón pronéfrico del embrión de pollo es considerado vestigial (debido a que no tiene la capacidad de concentrar orina), éste es el origen del esbozo ureteral que induce la formación de un riñón funcional durante el desarrollo del pollo (véase cap. 14).

Un ejemplo fascinante de una restricción filética es la ausencia de una variación entre las extremidades de los marsupiales. Mientras que las extremidades de los eutherianos muestran un espectacular rango de diversidad (garras, alas, palas, aletas y manos), las extremidades de los marsupiales son más o menos las mismas en todas las especies. Sears (2002) ha documentado que la necesidad para el feto marsupial de arrastrarse en la bolsa de su madre es una restricción al desarrollo de la extremidad de modo tal que la musculatura y el cartílago de la extremidad se desarrollan muy temprano hacia una estructura que puede agarrase y arrastrarse. Cualquier otra variación ha sido eficazmente eliminada.

A medida que los genes adquieren nuevas funciones durante la evolución, ellos se involucran en más de un módulo, haciendo difíciles los cambios. Galis (Galis 1999; Galis y Metz 2001) especuló que los mamíferos tienen solo siete vértebras cervicales (mientras que las aves pueden tener docenas) debido a que los genes Hox que especifican a estas vértebras han llegado a relacionarse con la proliferación celular en mamíferos. Por lo tanto, los cambios en la expresión génica Hox que podrían facilitar los cambios evolutivos en el esqueleto podrían inadvertidamente alterar la regulación de la proliferación celular y llevar a cánceres. Ella sostuvo esta especulación con la evidencia epidemiológica que demostraba que cambios en la morfología esquelética se correlacionan con cáncer en la niñez. De modo semejante, Galis y col. (Galis y col. 2002) proporcionaron evidencia que indica que la razón por la cual la red génica de polaridad de segmento está conservada en todos los tipos de insectos es que estos genes cumplen papeles en

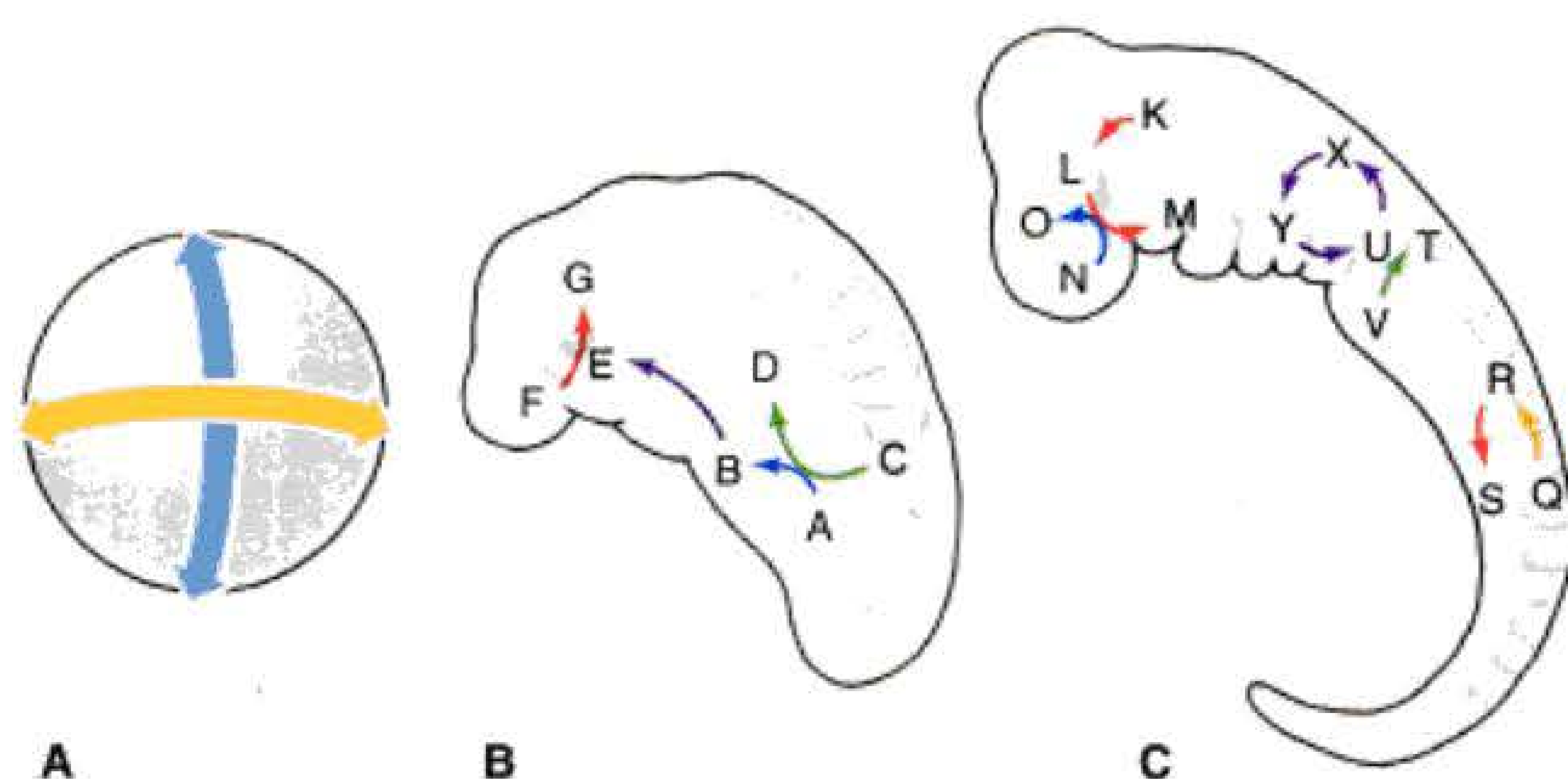


Fig. 23-28. Mecanismo para el cuello de botella en el estadio de faríngula del desarrollo de vertebrados. **A.** En la segmentación del embrión existen interacciones globales, pero hay muy pocas de ellas (principalmente para especificar los ejes del organismo). **B.** En los estadios de néurula o de faríngula, hay muchas interacciones inductivas globales. **C.** Después del estadio de faríngula, hay aún más interacciones inductivas, pero son efectos primariamente locales de hecho confinados a sus propios módulos. (Según Raff 1994.)

varias vías diferentes. Tal pleiotropía restringe las posibilidades para mecanismos alternativos, debido a que esto dificulta los cambios.

Hasta hace poco, se pensaba que los estadios más tempranos del desarrollo deberían ser los más duros al cambio, debido a que su alteración podría destruir al embrión o generar un fenotipo radicalmente nuevo. Pero trabajos recientes (y la revaluación de antiguos trabajos; véase Raff y col. 1991) han demostrado que ciertas alteraciones pueden ser hechas hasta en la segmentación temprana sin afectar la forma final. Las modificaciones evolutivas de los determinantes citoplasmáticos en los embriones de moluscos pueden dar origen a nuevos tipos de larvas que aun así metamorfosean hacia moluscos, y los cambios en los determinantes citoplasmáticos del erizo de mar pueden generar erizos de mar que se desarrollan directamente (sin estadio larval), pero que aun así llegan a ser erizos de mar.

Los estadios más tempranos del desarrollo, entonces, parecen ser extremadamente plásticos. Los estadios tardíos son muy diferentes de una especie a la otra, como lo demuestran ampliamente los diferentes fenotipos de ratones, pez cebra, serpientes y tritones. Sin embargo, hay algo en la mitad del desarrollo que parece ser constante. Sander (1983) y Raff (1994) han argumentado que la formación de un nuevo plan corporal (*Baupläne*) es inhibida por las consecuencias globales de la inducción durante el **estadio filotípico**; el estadio que tipifica a un filo. Por ejemplo, la néurula tardía, también conocida como la **faríngula**, es el estadio filotípico que parece ser crítico para todos los vertebrados (véanse figs. 23-17 y 1-5; Slack y col. 1993). Y en realidad, mientras que todos los vertebrados llegan al estadio de faríngula, ellos lo hacen por medios muy diferentes. Las aves, los reptiles y los peces llegan a éste después de segmentaciones meroblásticas de diferentes tipos; los anfibios llegan a éste por medio de una segmentación holoblástica radial y los mamíferos alcanzan el mismo estadio después de construir un blastocisto, un corion y un amnios (véase cap. 11).

Antes del estadio de faríngula de los vertebrados, hay pocos acontecimientos inductivos y la mayor parte de ellos está en escalas globales (que involucran la especificación del eje). En estos estadios tempranos de desarrollo, hay mucha regulación, de modo que pequeños cambios en las distribuciones de los morfógenos o en la posición de los planos de segmentación pueden ser acomodados (fig. 23-28; Henry y col. 1989). Después del estadio de faríngula, hay muchos más acontecimientos inductivos, pero la mayor parte de ellos se produce dentro de módulos diferenciados. El cristalino induce la córnea, pero si falla en hacerlo, solamente el ojo es afectado. Pero durante el estadio filotípico de faríngula, los módulos interactúan. El fracaso para tener al corazón en un cierto lugar puede afectar la inducción de los ojos (véase fig. 6-4). Las fallas de inducción del mesodermo en ciertas regiones llevan a malformaciones de los riñones, de las extremidades y de la cola. Mediante la búsqueda de bibliografía sobre anomalías congénitas, Galis y Metz (2001) han documentado que el estadio de faríngula es mucho más vulnerable que cualquier otro estadio. Además, basados en los patrones de múltiples anomalías de órganos dentro de la misma persona, concluyeron que estas malformaciones eran debidas a las interacciones entre los módulos en este estadio. Por lo tanto, este estadio filotípico que tipifica el filo vertebrado parece restringir su evolución. Una vez que un organismo se convierte en un vertebrado, es difícil (si no imposible) evolucionar hacia algo más.

SITIO WEB 23.11 **Cambio de los rasgos embrionarios a través de la selección natural (Changing embryonic traits through natural selection).** Así como los cambios en el embrión pueden producir nuevos fenotipos, la selección natural sobre los adultos puede favorecer ciertos tipos de embriones que producen fenotipos adultos favorables. Esta selección de rasgos adultos puede explicar la conservación de algunos patrones de desarrollo así como las desviaciones de la norma.

SITIO WEB 23.12 **Mecanismos alternativos para la biología del desarrollo evolutiva (Alternative mechanisms for evolutionary developmental biology).** La evolución es llevada a cabo mediante cambios heredables en el desarrollo. En este libro se acepta que estos cambios heredables son los que alteran los patrones de expresión génica. Sin embargo, se propusieron otros modelos en los que hay transmisión horizontal de la información genética entre los filos o en los que hay herencia de propiedades citoplasmáticas.

Información adicional y especulaciones

Canalización y liberación de las restricciones del desarrollo

Las restricciones morfogenéticas son uno de los principales modos de evitar ciertas variaciones genéticas. Sin embargo, éste no es el único camino. Sorprendentemente, muchas mutaciones nuevas se están produciendo, incluso en genes vitales, que no afectan el desarrollo. En su lugar, el desarrollo parece ser amortiguado de modo tal que pequeñas anomalías del genotipo o leves perturbaciones en el ambiente no llevan a la formación de fenotipos anormales (Waddington 1942; Siegal y Bergman 2002). Este fenómeno, denominado **canalización**, sirve como una restricción adicional sobre la evolución de nuevos fenotipos.

Es difícil para una mutación afectar realmente al desarrollo (Nijhout y Paulsen 1997). Es poco frecuente la mutación que es ciento por ciento penetrante. La canalización permite que las mutaciones se acumulen en el genotipo sin ser expresadas en el fenotipo (y, por lo tanto, sin ser inmediatamente accesibles a la selección natural). Por consiguiente, a corto plazo, ésta limita la variabilidad del fenotipo al promover la variación genética críptica. Sin embargo, a largo plazo, la canalización puede actuar como un capacitador para el cambio del fenotipo, debido a que permite a los alelos mutantes acumularse en el genoma sin ser expresados. Tal variabilidad genética críptica puede hacerse manifiesta mediante cambios en las condiciones ambientales, y puede entonces ser seleccionada.

La canalización puede ser el resultado de la redundancia genética. Uno de los principales descubrimientos recientes de la biología del desarrollo ha sido la estabilidad del fenotipo incluso después de la supresión de genes importantes del desarrollo (Wilkins 1997; Morange 2001). En muchos ejemplos, la pérdida de función de un gen particular es compensada por la activación de otro gen que, a veces, incluso no es de la misma familia estructural como el que se ha suprimido. En otros ejemplos, hay en realidad otra proteína en la célula cuyas actividades son parcialmente redundantes con las de la proteína codificada por el gen suprimido (Erickson 1993; Wilkins 1997). Nowak y colegas (1997) han proporcionado modelos matemáticos para explicar cómo tal redundancia puede ser seleccionada y cómo la redundancia puede ser evolutivamente estable.

La canalización también puede resultar de la capacidad amortiguadora *(buffer)* de las proteínas de choque térmico *(heat shock proteins)*. Se sabe desde hace mucho tiempo que el estrés, en la forma de factores ambientales como la temperatura, puede sobrepasar a los sistemas de amortiguación del desarrollo y alterar el fenotipo. El fenotipo alterado llega a estar sujeto a la selección natural y si es seleccionado, finalmente aparecerá sin el estrés que lo había inducido originalmente. Waddington denominó a este fenómeno asimilación genética (véase cap. 22). Por ejemplo, cuando Waddington sometió a las larvas de *Drosophila* de una cierta cepa a elevadas temperaturas, ellas perdieron sus venas transversales del ala. Después de unas pocas generaciones de choque térmico repetido, el fenotipo sin venas transversales continuó siendo expresado incluso sin el tratamiento con choque térmico. Mientras que los resultados de Waddington parecían un caso de "herencia de características adquiridas", no hay evidencia para tal opinión. Ciertamente, el fenotipo sin venas transversales no fue una respuesta adaptativa al calor. Ni el choque térmico causó las mutaciones que llevaron a que esto se produzca. En su lugar, el choque térmico sobrepasó el sistema de amortiguación, permitiendo que las mutaciones preexistentes dieran origen al fenotipo sin venas transversales.

En 1998, Suzanne Rutheford y Susan Lindquist demostraron que el principal agente responsable para esta amortiguación era la "proteína de choque térmico" **Hsp90**. La Hsp90 se une a una serie de moléculas de transducción de la señal que son intrínsecamente inestables. Cuando ésta se une a ellas, estabiliza sus estructuras terciarias de modo tal que ellas pueden responder a moléculas de señalización corriente arriba. Sin embargo, la proteína de choque térmico hace que otras proteínas en la célula se vuelvan inestables, y Hsp90 es desviada de su función normal (de estabilización de las proteínas de transducción de la señal) a una función más general de estabilización de cualquiera de los péptidos ahora parcialmente desnaturalizados de la célula (Jakob y col. 1995; Nathan y col. 1997). Debido a que se sabía que Hsp90 estaba involucrada en las proteínas intrínsecamente inestables y que podía ser desviada por el estrés, los investigadores sospecharon que ésta podría estar involucrada en las vías del desarrollo de la amortiguación contra las eventualidades ambientales.

La evidencia para el papel de Hsp90 como un amortiguador del desarrollo primero vino de las mutaciones de *Hsp83*, el gen para Hsp90. Las mutaciones homocigotas de Hsp83 son letales en *Drosophila*. Las mutaciones heterocigotas incrementan la proporción de anomalías del desarrollo en la población en la que ellas son introducidas. En las poblaciones de *Drosophila* heterocigotas para el mutante *Hsp83*, aparecen ojos deformados, duplicaciones de quetas y anomalías de las patas y de las alas (fig. 23-29). Cuando diferentes alelos mutantes de *Hsp83* fueron reunidos en las mismas moscas, se incrementó la incidencia y la severidad de las anomalías. Las anomalías también fueron vistas cuando un inhibidor específico de Hsp90 (geldanamicina) fue agregado a la comida de las moscas tipo salvaje, y los tipos de defectos vistos diferían entre las diferentes estirpes de moscas. Las anomalías observadas no mostraban una herencia mendeliana simple, sino que fueron la consecuencia de las interacciones de varios productos génicos. La reproducción selectiva de las moscas con las anomalías llevó en pocas generaciones a poblaciones en las que el 80-90% de las progenies tenían el fenotipo mutante. Además, estas progenies mutantes no tenían todas la misma mutación de *Hsp83*. En otras palabras, una vez que la mutación en *Hsp83* ha permitido que sea expresada la mutación crítica, los apareamien-



Fig. 23-29. Desarrollo de los amortiguadores (buffers) Hsp90. **A**, **B**. Las anomalías del desarrollo en *Drosophila* asociadas con mutaciones en el gen *Hsp83* incluyen **A**, ojos deformados y **B**, venas del ala engrosadas. **C**. La característica del ojo deformado vista en **A** fue seleccionada mediante la cría de solo los individuos que expresan la característica. Esta anomalía no fue observada en el linaje original, pero puede observarse en una alta proporción de los descendientes de individuos que son apareados a moscas *Hsp83* heterocigotas. La fuerte respuesta a la selección demostró que aunque la población era pequeña, contenía gran cantidad de variación genética oculta. (Según Rutherford y Lindquist 1998; fotografías cortesía de los autores.)

tos selectivos conservan el fenotipo anormal incluso ante la ausencia de Hsp90 anormal.

Por lo tanto, Hsp90 es probablemente el principal componente del sistema de amortiguación que permite la canalización del desarrollo. Ésta proporciona una vía para resistir a las fluctuaciones del fenotipo que podrían de otro modo resultar en la formación de mutaciones o cambios ambientales mínimos. La Hsp90 también podría ser responsable de permitir la acumulación de mutaciones, pero manteniéndolas sin ser expresadas hasta los cambios ambientales. Ninguna mutación individual tendría que cambiar el fenotipo, pero el apareamiento podría permitir que estas mutaciones sean "acumuladas" por los miembros de una población. Un cambio ambiental (cualquier cosa que podría generar estrés en la célula) podría, de este modo, liberar las posibilidades fenotípicas ocultas de una población. En otras palabras, la disminución pasajera en Hsp90 (que resulta de su ayuda a las proteínas dañas por el estrés) tendría que sacar a la luz variaciones genéticas preexistentes que producirían variaciones morfológicas. La mayor parte de estas variaciones morfológicas tendrían que ser probablemente nocivas, pero algunas podrían ser seleccionadas para el nuevo ambiente. Tal liberación de una variación morfológica oculta puede ser responsable de muchos ejemplos de rápida especiación hallados en los registros fósiles.

Una nueva síntesis evolutiva

En 1922, Walter Garstang declaró que la **ontogenia** (el desarrollo de un individuo) no recapitula la **filogenia** (historia evolutiva); en su lugar, ésta crea la filogenia. La evolución es generada por cambios heredables en el desarrollo. "La primera ave", dijo Garstang, "eclosionó desde un huevo de reptil". Por lo tanto, cuando se dice que el caballo contemporáneo de un dedo evolucionó a partir de un ancestro de cinco dedos, se está diciendo que se han producido cambios heredables en la diferenciación del mesodermo de la extremidad hacia condrocitos durante la embriogénesis en el linaje del caballo. La evolución, dijo Richard Goldschmidt (1940), es el resultado de cambios heredables en el desarrollo, y esto es tan verdadero como si una mosca tiene dos o tres quetas sobre su dorso así como si un apéndice llegará a convertirse en aleta o en una extremidad.

Esta opinión de la evolución como el resultado de cambios hereditarios que afectan el desarrollo se perdió en gran parte durante la década de 1940, cuando la Síntesis Moderna de la genética de población y la biología evolutiva sentaron nuevas bases para la investigación en la biología evolutiva. La Síntesis Moderna ha sido uno de los grandes logros intelectuales de la biología. Mediante la fusión de las tradiciones de Darwin y de Mendel, puede explicarse la evolución dentro de una especie: la diversidad dentro de una población se originó de la producción al azar de mutaciones, y el ambiente actuó para seleccionar los fenotipos más adecuados. Aquellos individuos más capaces de reproducirse deberían transmitir los genes que les otorgaron sus ventajas. Tales genes incluyeron, por ejemplo, los que codifican enzimas con altos índices de síntesis y globinas con gran capacidad de transporte de oxígeno. Se asumió que los mismos tipos de cambios (mutaciones genéticas o cromosómicas) que causaron la evolución dentro de una especie también provocaron la evolución de nuevas especies. Si un nuevo fenotipo iba a ser producido, debería ser necesaria una acumulación de estas mutaciones, y un mecanismo de aislamiento reproductivo que les permita acumularse en nuevas combinaciones.

La Síntesis Moderna no solo puede explicar sorprendentemente bien la evolución dentro de una especie, sino que también explicó preguntas relevantes desde el punto de vista médico, como por qué ciertos alelos que parecen perjudiciales (p. ej., la variante del gen de la hemoglobina que puede causar la anemia de células falciformes) podrían ser seleccionados por ciertas poblaciones. La aproximación de la genética de población a la evolución fue resumida por uno de sus profesionales y teóricos más destacados, Theodosius Dobzhansky, cuando declaró: "La evolución es un cambio en la composición genética de las poblaciones. El estudio de los mecanismos de la evolución cae dentro de la provincia de la genética de población" (Dobzhansky 1951).

Cuando la Síntesis Moderna fue formulada, la biología del desarrollo y la genética del desarrollo no eran ciencias establecidas. A medida que la Síntesis se vio fortalecida por la sistemática, la biología de plantas y la paleontología, fue poco lo que la biología del desarrollo pudo agregar. Las preguntas formuladas en la biología evolutiva podían ser respondidas sin recurrir a la biología del desarrollo, y la aproximación del desarrollo llegó a ser excluida de la Síntesis Moderna (Hamburguer 1980; Gottlieb 1992; Dietrich 1995; Gilbert y col. 1996). Se pensaba que la genética de población podía explicar la evolución, entonces la morfología y el desarrollo eran vistos como jugando un pequeño papel en la teoría evolutiva moderna (Adams 1991). En otras palabras, la **macroevolución** (los grandes cambios morfológicos vistos entre especies, clases y filos) podía explicarse por los mecanismos de la **microevolución**, que es la evolución dentro de una especie, y puede describirse como "valores adaptativos diferenciales del genotipo o desviaciones del apareamiento al azar o ambos de estos factores actuando en conjunto" (Torrey y Feduccia 1979).

Sin embargo, el modelo genético de población de evolución contenía algunas suposiciones fundamentales que ahora han sido puestas en duda.

- **Gradualismo.** La suposición de que todos los cambios evolutivos se producen de manera gradual fue debatida por Darwin y sus amigos. Thomas Huxley, por ejemplo, aceptó la evolución, pero consideraba que Darwin había cargado su teoría con una suposición innecesaria de gradualismo. Un siglo más tarde, Eldredge y Gould (1972), Stanley (1979), y otros postularon un **equilibrio interrumpido** *(punctuated equilibrium)* como una alternativa para el gradualismo que caracterizaba a la Síntesis Moderna. De acuerdo con esta teoría, las especies estaban caracterizadas por su estabilidad morfológica. Los cambios evolutivos tienden a ser rápidos, no graduales. Al mismo tiempo, los estudios moleculares (Kina y Wilson 1975) demostraron que el 99% del DNA de los seres humanos y de los chimpancés era idéntico, lo que demuestra que un pequeño cambio en el DNA puede causar grandes e importantes cambios morfológicos. Los nuevos hallazgos en la paleontología y en la biología molecular indujeron a los científicos a considerar seriamente la opinión de que las mutaciones en los genes reguladores pueden crear grandes cambios en la morfología en un tiempo relativamente corto.
- **Extrapolación de la microevolución a la macroevolución.** La idea de que la acumulación de pequeñas mutaciones da como resultado cambios que llevan a taxa superiores también ha sido criticada. Goldschmidt (1940) comenzó su libro *Las bases materiales de la evolución* (*The Material Basis of Evolution*) preguntando a los biólogos evolutivos de genética de población que trataran de explicar la evolución del pelo en los mamíferos, de las plumas en las aves y del aparato del veneno de las serpientes. Curiosamente, Goldschmidt y Waddington vieron las mutaciones homeóticas como el tipo de cambio genético que puede cambiar una estructura hacia otra y, posiblemente, crear nuevas estructuras o nuevas combinaciones de estructuras. Estas mutaciones no deberían ser en los genes estructurales, sino en los genes reguladores.
- **Carencia de semejanza genética en organismos distintos.** Hemos hecho un largo camino desde que Ernst Mayr (1966) pudo plantear, con respecto a la macroevolución: "Mucho de lo que ha sido aprendido acerca de la fisiología del gen hace evidente que la búsqueda para genes homólogos es bastante inútil excepto para los parientes muy cercanos". En efecto, cuando se consideran a los genes Hox, las vías de transducción de la señal, y las familias de los factores paracrinos, las moléculas de adhesión, y los factores de transcripción, se ha visto que lo opuesto es el caso. Los organismos adultos pueden tener estructuras diferentes, pero los genes que instruyen la formación de estas estructuras son extremadamente semejantes.

El modelo de genética de población fue formulado para explicar la selección natural. Éste está basado en diferencias genéticas en los organismos adultos que compiten por la ventaja reproductiva. El modelo de genética del desarrollo ha sido formulado para explicar la filogenia; evolución por encima del nivel de especie. Éste está basado en las semejanzas entre los genes reguladores que son activos en los embriones y en las larvas. Todavía nos estamos aproximando a la evolución a través de los dos caminos que Darwin reconoció. Ambos puntos de vista involucran descendencia con modificación, y se puede poner énfasis en las semejanzas o en las diferencias entre los taxa. Por lo tanto, cuando se enfrentaron a la pregunta de cómo se originó el plan corporal de los artrópodos, Hughes y Kaufman (2003) comenzaron su estudio: "Responder esta pregunta mediante la invocación de la selección natural es correcto pero insuficiente. Los colmillos de un centípedo... y las pinzas de una langosta le confieren a estos organismos ventajas apropiadas. Sin embargo, el quid de la cuestión es: ¿A partir de qué cambios genéticos del desarrollo se originan estas novedades en primer lugar?"

Está emergiendo ahora un acercamiento entre la explicación de la evolución de la genética de población y la explicación de la evolución de la genética del desarrollo. La aproximación de la genética de población se ha centrado sobre las variaciones dentro de las poblaciones, mientras que la aproximación de la genética del desarrollo se ha centrado sobre la variación entre las poblaciones (Amundson 2001; Gilbert 2000). De modo semejante, los genetistas de población han estado analizando prima-

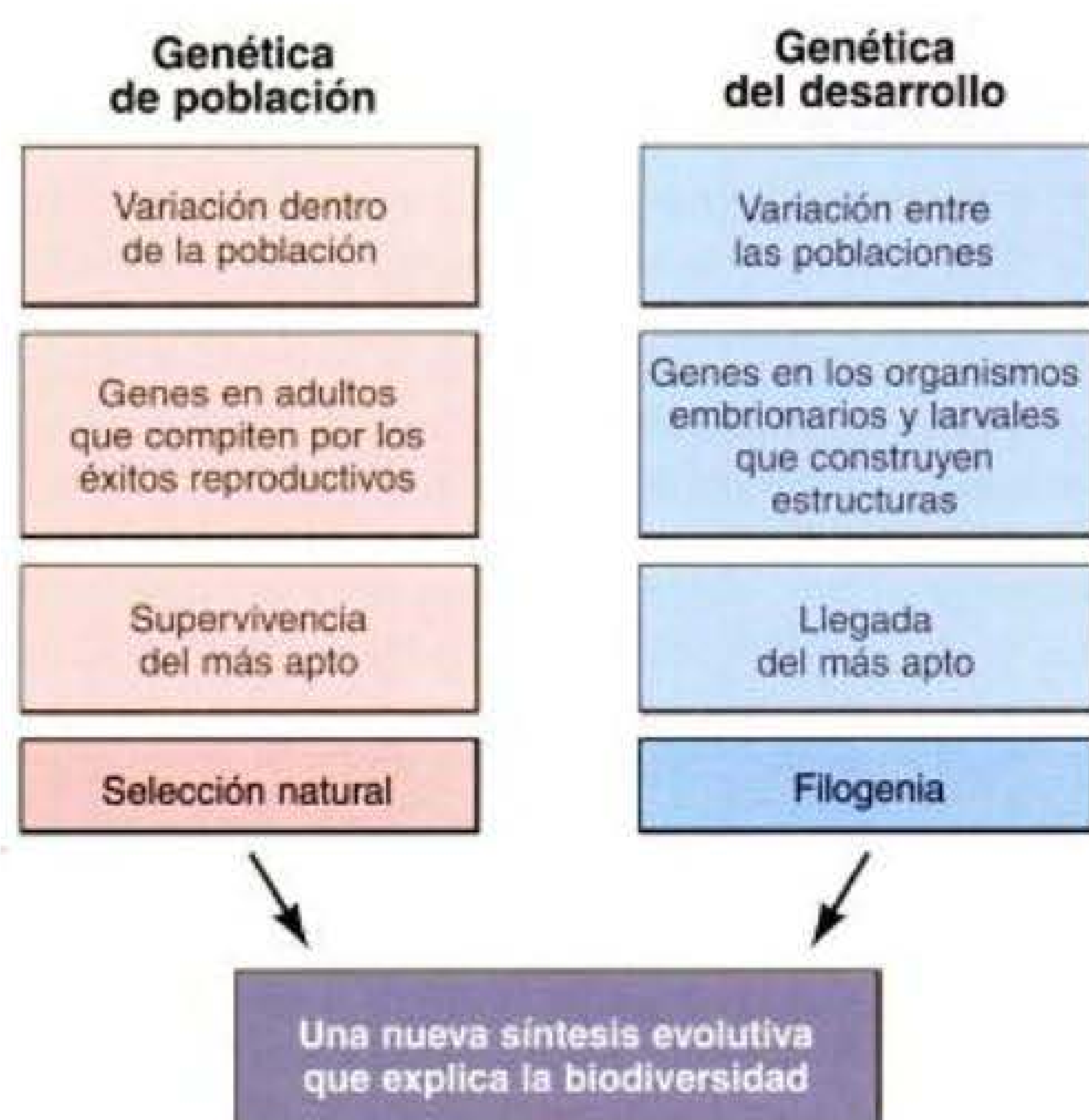


Fig. 23-30. Una nueva síntesis evolutiva que está emergiendo. La aproximación clásica a la evolución ha sido la de la genética de población. Esta aproximación pone énfasis en las variaciones dentro de una especie que permiten que ciertos individuos adultos se reproduzcan más frecuentemente; por lo tanto, ésta puede explicar la selección natural. La aproximación al desarrollo analiza la variación entre las poblaciones y pone énfasis en la respuesta de los genes reguladores para la formación del órgano. Ésta es mucho más capaz de explicar las novedades y restricciones evolutivas. Juntas, estas dos aproximaciones constituyen una aproximación genética más completa a la evolución.

riamente a los genes en adultos que compiten por el éxito reproductivo, mientras que los genetistas del desarrollo han estado analizando a los genes involucrados en la formación de los órganos embrionarios y larvales. Estas diferencias están comenzando a hacerse borrosas a medida que los genetistas de población y los de desarrollo comienzan a analizar los genes reguladores que controlan el desarrollo (véase Arthur 1997; Macdonald y Goldstein 1999; Zeng y col. 1999). Las dos aproximaciones se complementan entre sí: mientras que la aproximación de la genética de población se centra en la supervivencia de los más aptos, la aproximación de la genética del desarrollo a la evolución está más interesada en la *llegada* a lo más apto.

La biología del desarrollo evolutiva ya está comenzando a proporcionar respuestas a las preguntas de la genética evolutiva clásica. Los biólogos evolutivos han estudiado durante mucho tiempo problemas como el mimetismo y el melanismo industrial. Ahora, los genes involucrados en estos procesos están comenzando a ser identificados, de modo tal que pueden ser explicados los mecanismos subyacentes al fenómeno (Koch y col. 1998; Brakefield 1998). Para explicar la evolución, se requieren las versiones de la genética de población y de la genética del desarrollo (fig. 23-30).

Al dejar a la biología del desarrollo fuera de la biología evolutiva se ha dejado a la biología evolutiva abierta al ataque por los creacionistas. De acuerdo con Behe (1996), la genética de población no puede explicar el origen de estructuras como el ojo, entonces el darwinismo debe ser falso.* ¿Cómo puede una estructura tan complicada haber surgido por una colección de mutaciones al azar? ¿Si una mutación causó un cambio en el cristalino, cómo puede ser compensada por cambios en la retina? Las mutaciones deberían servir solamente para destruir órganos complejos, no para crearlos. Sin embargo, una vez que se agrega el desarrollo a la síntesis evolutiva, se puede ver cómo el ojo se desarrolla a través de la inducción, y que los conceptos de modularidad y progresión correlacionada pueden explicar fácilmente tal fenómeno (Waddington 1940; Gehring 1998). Además, cuando se ve que la formación del ojo en todos los filos conocidos está basada en la misma vía de la transducción de la señal, utilizando el gen *Pax6*, no es difícil ver que la descendencia con modificación forma a los diversos tipos de ojos. Esto fue mucho más difícil antes de que se haya descubierto la semejanza de instrucciones en la formación del ojo. En efecto, un estudio basado en la genética de población afirmaba que los fotorreceptores del ojo se habían originado independientemente más de 40 veces durante la historia del reino animal (Salvini-Plawen y Mayr 1977).

SITIO WEB 23.13 **"Creacionismo científico" y "diseño inteligente" ("Scientific Creationism" and "Intelligent Design").** Los creacionistas modernos a menudo niegan que los genes desempeñen un papel en el desarrollo, debido a que esto debería permitir que se produzca la evolución. Estos sitios web examinan el "creacionismo científico" y el "diseño inteligente" e incluyen conferencias sobre cómo la biología del desarrollo evolutiva proporciona algunas de las mejores evidencias contra el creacionismo.

En su revisión de evolución en 1953; J. B. S. Haldane expresó sus pensamientos sobre la evolución con la siguiente analogía del desarrollo: "El actual estadio de la teoría evolutiva puede ser definido por libros como los de Huxley, Simpson, Dobzhansky, Mayr y Stebbins (los fundadores de la Síntesis Moderna). Nosotros, seguramente, no estamos listos para una nueva muda, pero los signos de nuevos órganos quizás son visibles". Este reconocimiento de las ideas del desarrollo "señala hacia adelante una síntesis más amplia en el futuro". Finalmente hemos roto a través del viejo tegumento pupal y una síntesis evolutiva nueva, más amplia inclusiva del desarrollo está tomando vuelo.

* Behe (1996) hizo esto explícitamente, utilizando el ejemplo del ojo. Aunque intentó refutar la teoría de la evolución utilizando el ojo como ejemplo, nunca mencionó los estudios sobre Pax6. En su lugar, mencionó las teorías de la década de 1980 (basadas únicamente sobre genética de población) y las extendió como ciencia contemporánea.

Resumen: biología del desarrollo evolutiva

1. La evolución es causada por la herencia de cambios en el desarrollo. Las modificaciones del desarrollo embrionario o larval pueden crear nuevos fenotipos que pueden luego ser seleccionados.
2. El concepto de Darwin de "descendencia con modificación" explicó las homologías y las adaptaciones. Las semejanzas de estructura son debidas a un ancestro común (homología), mientras que las modificaciones fueron debidas a la selección natural (adaptación a las circunstancias ambientales).
3. El ancestro Urbilateria puede ser extrapolado al estudiar los genes del desarrollo que son comunes a los protostomas y deuterostomas, y que llevan a cabo funciones semejantes. Éstos incluyen a los genes Hox que especifican los segmentos corporales, el gen *tinman* que regula el desarrollo cardíaco; el gen *Pax6* que especifica las regiones capaces de formar ojos y los genes que instruyen la formación de la cabeza y de la cola.
4. Los cambios en la secuencia de los genes Hox pueden darles nuevas propiedades que pueden tener efectos del desarrollo significativos. La restricción sobre la anatomía del insecto de tener solo seis patas es una de ellas.
5. Los cambios en los *blancos* de los genes Hox pueden alterar los efectos de aquellos genes. En respuesta a la proteína Ubx, por ejemplo, el tercer segmento torácico especifica halterios en las moscas pero alas posteriores en las mariposas.
6. Los cambios en la expresión génica Hox *dentro* de una región pueden alterar las estructuras formadas por esta región. Por ejemplo, los cambios en la expresión de Ubx y abdA en insectos regulan la producción de patas falsas en los segmentos abdominales de las larvas.
7. Los cambios en la expresión génica Hox *entre* las regiones corporales pueden alterar las estructuras formadas por cada región. En los crustáceos, patrones de expresión Hox diferentes permiten que el cuerpo tenga maxilípedos sobre sus segmentos torácicos o carezca de ellos.
8. Los cambios en la expresión génica Hox están correlacionados con los fenotipos sin extremidades de las serpientes.
9. Los cambios en el *número* génico Hox permiten que los genes Hox asuman nuevas funciones. Los grandes cambios en los números de genes Hox se correlacionan con las principales transiciones de la evolución.
10. Las duplicaciones de los genes también pueden permitir que estos genes sean expresados en nuevos lugares. La formación de nuevos tipos celulares puede resultar a partir de genes duplicados cuya regulación ha divergido.
11. Además de las estructuras y genes que son homólogos, las vías de transducción de la señal pueden ser homólogas. En estos casos, las proteínas homólogas están organizadas en rutas homólogas. Estas vías pueden ser utilizadas para diferentes procesos de desarrollo en diferentes organismos y dentro del mismo organismo.
12. La modularidad del desarrollo permite que algunas partes del embrión cambien sin afectar a otras.
13. La disociación de un módulo de otro se muestra por la heterocronía (un cambio en el ritmo de desarrollo de una región con respecto a la otra) y por la alometría (un cambio en los índices de crecimiento de las diferentes partes del organismo en relación con las otras).
14. La alometría puede crear nuevas estructuras (como la bolsa de la mejilla de la ardilla de bolsillo) al cruzar un umbral.
15. La duplicación y la divergencia son mecanismos importantes de evolución. A nivel genético, los genes Hox y muchas otras familias de genes comenzaron como genes individuales que fueron duplicados. Los miembros divergentes de tal familia de genes pueden asumir diferentes funciones.
16. Los cambios en la expresión génica parecen explicar la ausencia de extremidades en las serpientes, la retención de las membranas interdigitales en las patas del pato, el surgimiento de las alas y la evolución de molares modelados de modo diferente.
17. La co-opción (reclutamiento) de genes y vías existentes para nuevas funciones es un mecanismo fundamental para la creación de nuevos fenotipos. Uno de estos casos es el uso de la vía de señalización del desarrollo de la extremidad para formar las manchas oculares en las alas de las mariposas.
18. Las restricciones del desarrollo evitan que se produzcan ciertos fenotipos. Tales restricciones pueden ser físicas (miembros que no giran), morfogenéticas (sin dígito medio más pequeño que sus vecinos), o filéticas (sin tubo neural sin una notocorda).
19. La proteína Hsp90 le permite a las células acumular mutaciones sin expresarlas. Cuando el organismo es sometido a estrés durante el desarrollo, estas "mutaciones crípticas" pueden emerger en nuevos fenotipos.
20. La fusión del modelo de genética de población con el modelo de genética del desarrollo de la evolución está creando una nueva síntesis evolutiva para los fenómenos macroevolutivos así como para los microevolutivos.

Bibliografía citada

Acampora, D., S. Mazan, Y. Lallemand, V. Avantaggiato, M. Maury, A. Simeone and P. Brulet. 1995. Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2[+/-] mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. Development 121: 3279-3290.

Adams, M. 1991. Through the looking glass: The evolution of Soviet Darwinism. In L. Warren and H. Koprowski (eds.), New Perspectives in Evolution. Liss/Wiley, New York, pp. 37-63.

Adoutte, A., G. Balavoine, N. Lartillot

Holland, L. Z. and N. D. Holland. 2001. Evolution of neural crest and placodes: Amphioxus as a model for the ancestral vertebrate? J. Anat. 199: 85-98.

Holland, N. D. and J. Chen. 2001. Origin and early evolution of the vertebrates: New insights from advances in molecular biology, anatomy, and paleobiology. BioEssays 23: 142-151.

Holland, N. D. and L. Z. Holland. 1999. Amphioxus and the utility of molecular genetic data for hypothesizing body part homologies between distantly related animals. Am. Zool. 39: 630-640.

Holland, N. D., G. Panganiban, E. L. Henyey and L. Z. Holland. 1996. Sequence and developmental expression of AmphiDll, an amphioxus Distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis, and nervous system: Insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. Development 122: 2911-2920.

Holland, P. W. H. 1998. Major transitions in animal evolution: A developmental genetic perspective. Am. Zool. 38: 829-842.

Holland, P. W. H. and J. García-Fernández.1996. Hox genes and chordate evolution. Dev. Biol. 173: 382-395.

Holley, S., P. D. Jackson, Y. Sasai, B. Lu, E. M. De Robertis, F. M. Hoffmann and E. L. Ferguson. 1995. A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. Nature 376: 249-23.

Hopson, J. A. 1966. The origin of the mammalian middle ear. Am. Zool. 6: 437-450.

Hughes, C. GG. and T. C. Kaufman. 2002. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. Evo. Dev. 4: 459-499.

Huxley, J. and G. Teissier. 1936. Terminology of relative growth. Nature 137: 780-781.

Ingham, P. W. 1994. Hedgehog points the way. Curr. Biol. 4: 345-350.

Jacob, F. 1977. Evolution and tinkering. Science 196: 1161-1166.

Jakob, U., H. Lilie, I. Meyer and J. Buchner.1995. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase: Implications for heat shock in vivo. J. Biol. Chem. 270: 7288-7294.

Jean, D., K. Ewan and P. Gruss. 1998. Molecular regulators involved in vertebrate eye development. Mech. Dev 76: 3-18.

Jeffery, J. E., O R. P. Beninda-Emonds, M. I. Coates and M. K. Richardson. 2002. Analyzing evolutionary patterns in amniote embryonic development. Evol. Dev. 4: 292-302.

Jernvall, J., S. V. Keranen and I. Thesleff. 2000. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: Quantifying gene expression patterns and topography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14444-14448.

Keys, D. N. and 8 others. 1999. Recruitment of a hedgehog regulatory circuit un butterfly eyespot evolution. Science 283: 532-534.

King, M. C. and A. C. Wilson. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. Science 188: 107-116.

Kmita, M. F., F. van der Hoeven, J. Zákány, R. Krumlauf and D. Duboula. 2000. Mechanisms of Hox gene colinearity: Transposition of the anterior Hoxb-1 gene into the posterior HoxD complex. Genes Dev. 14: 198-211.

Kmita, M. F., N. Frandeau, Y. Hérault and D. Duboule. 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. Nature 420: 145-150.

Knoll, A. H. and S. B. Carroll. 1 999. Early animal development: Emerging views from comparative biology and geology. Science 256: 622-627.

Koch, P. B., D. N. Keys, T. Rocheleau, K. Aronstein, M. Blackburn, S. B. Carroll and R. H. ffrench-Constant. 1998. Regulation of dopa decarboxylase expression during color pattern formation in wild-type and melanic tiger swallowtail butterflies. Development 125: 2303-2313.

Kukalova-Peck, J. 1992. The Uniramia do not exist: The ground plan of the Pterygota as revealed by Permian Diahanopterodea from Russia (Insecta: Paleodictyopteroidea). Can. J. Zool. 70: 236-255.

Kuratani, S., Y. Nobusada, N. Horigome and Y. Shigetani.2001. Embryology of the lamprey and evolution of the vertebrate jaw: Insights from molecular and developmental perspectives. Philos. Trans. Roy. Soc. Lond B 356: 1615-1632.

Larrain, J., M. Oelgeschlager, N. I. Ketpura, B. Reversade, L. Zakin and E. M. De Robertis. 2001. Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. Develoment 128: 4439-4447.

Larsen, E. W. 1992. Tissue strategies as developmental constraints: Implications for animal evolution. Trends Ecol. Evol. 7: 414-417.

Lohnes, D. and 7 others. 1994. Function of retinoic acid receptors in development. I. Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. Development 120: 2723-2743.

Loomis, C. A., E. Harris, J. Michaud, J. Wurst, W. Hanks and A. L. Joyner. 1996. The mouse Engrailed-I gene and ventral limb patterning. Nature 382: 360-363.

Lovejoy, A. O. 1964. The Great Chain of Being. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Macdonald, S. J. and D. B. Goldstein. 1999. A quantitative genetic analysis of male sexual traits distinguishing the sibling species Drosophila simulans and D. sechellia. Genetics 153: 1683-1699.

Maderson, P. F. A. 1972. On how an archosaurian scale might have given rise to an avian feather. Am. Nat. 106: 424-428.

Maderson, P. F. A. and L. Alibardi.2000. The development of the sauropsid integument: A contribution to the problem of the origin and evolution of feathers. Am. Zool. 40: 513-529.

Malicki, J., L. C. Cianetti, C. Peschle and W. McGinnis. 1992. Human HOX4B regulatory element provides head-specific expression in Drosophila embryos. Nature 358: 345-347.

Manak, J. R. and M. P. Scott. 1994. A class act: Conservation of homeodomain protein functions. Development [Suppl.] 61-71.

Manton, S. M. 1977. The Arthropoda: Habits, Functional Morphology, and Evolution. Clarendon Press, Oxford.

Manzanares, M., H. Wada, N. Itasaki, P. A. Trainor, R. Krumlauf and P. W. H. Holland. 2000. Conservation and elaboration of Hox gene regulation during evolution of the vertebrate head. Nature 408: 854-857.

Marigo, V., R. L. Johnson, A. Vortkamp and C. J. Tabin. 1996. Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during development of the tetrapod limb. Development 180: 273-283.

Mark, M., F. M. Rijli and P. Chambon. 1995. Alteration of Hox gene expression in the branchial region of the head causes homeotic transformations, hindbrain segmentation defects, and atavistic changes. Semin. Cell Dev. Biol. 6: 275-284.

Marqués, G., M. Musacchio, M. J. Shimell, K. Wunnenburg-Stapleton, K. W. Y. Cho and M. B. O'Connor. 1997. The Dpp activity gradient in the early Drosophila embryo is established through the opposing actions of the Sog and Tld proteins. Cell 91: 417-425.

Matsuo, I., S. Kuratani, C. Kimura, N. Takeda and S. Aizawa. 1995. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of the rostral head. Genes Dev. 9: 2646-2658.

Mayr, E. 1966. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Merino, R., J. Rodríguez-León, D. Macias, Y. Ganan, A. N. Economides and J. M. Hurle. 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. Development 126: 5515-5522.

Meulemans, D. and M. Bronner-Fraser. 2002. Amphioxus and lamprey AP-2 genes: Implications for neural crest evolution and migration patterns. Development 129: 4953-4962.

Miura, T. and K. Shiota. 2000a. TGF-β2 acts as an "activator" molecule in reaction-diffusion model and is involved in cell sorting phenomenon in mouse limb micromass culture. Dev. Dynam. 217: 241 -249.

Miura, T. and K. Shiota. 2000b. Extracellular matrix environment influence chondrogenic pattern formation in limb bud micromass culture: Experimental verification of theoretical models. Anat. Rec. 258: 100-107.

Monaghan, P., E. Grau, D. Bock and G. Schulz. 1995. The mouse homolog of the orphan nuclear receptor tailless is expressed in the developing brain. Development 121: 839-851.

Morange, M. 2001. the Misunderstood Gene. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Nathan, D. F., M. H. Vos and S. Lindquist. 1997. In vivo functions of the Saccharomycetes cerevisiae Hsp90 chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12949-12956.

Neidert, A. H., V. Virupannavar, G. W. Hooker and J. A. Langeland. 2001. Lamprey Dlx genes and early vertebrate evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1665-1670.

Newman, S. A. and H. L. Frisch. 1979. Dynamics of skeletal pattern formation in the developing chick limb. Science 205: 662-668.

Nielsen, M. G. and E. C. Raff 2002. The best of all worlds or the best possible world? Developmental constraint in the evolution of β-tubulin and the sperm tail axoneme. Evol. Dev. 4: 303-315.

Nijhout, H. F. and S. M. Paulsen. 1997. Developmental models and polygenic characters. Am. Nat. 149: 394-405.

Nowak, M. A., M. C. Boerlijst, J. Cooke and J. M. Smith. 1997. Evolution of genetic redundancy. Nature 388: 167-171.

Onuma, Y., S. Takahashi, M. Asashima, S. Kurata and W. J. Gehring. 2002. Conservation of Pax6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 2020-2025.

Oster, G. F., N. Shubin, J. D. Murray and P. Alberch. 1988. Evolution and morphogenetic rules: The shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny. Evolution 42: 862-884.

Panganiban, G., L. Nagy and S. B. Carroll. 1994. The role of the Distal-less gene in the development and evolution of insect limbs. Curr. Biol. 4: 671-675.

Panganiban, G. and 13 others. 1997. The origin and evolution of animal appendages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5162-5166.

Pasqualetti, M., M. Ori, I. Nardi and F. M. Rijli. 2000. Ectopic Hoxa2 induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in Xenopus. Development 127: 5367-5378.

Piatigorsky, J. and G. Wistow. 1991. The recruitment of crystallins: New functions precede gene duplication. Science 252: 1078-1079.

Piccolo, S., E. Agius, B. Lu, S. Goodman, L. Dale and E. M. De Robertis. 1997. Cleavage of chordin by the Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. Cell 91: 407-416.

Price, M. 1993. Members of the Dlx and Nkx2 gene families are regionally expressed in the developing forebrain. J. Neurobiol. 24: 1385-1399.

Prum, R. O. 1999. Development and evolutionary origin of feathers. J. Exp. Zool. 285: 291-306.

Qiu, M. S. and 8 others. 1997. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: Mutations of Dlx-1, Dlx-2 and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soh tissue structures derived from the first and second arches. Dev. Biol. 185: 165-184.

Raff, R. A. 1994. Developmental mechanisms in the evolution of animal form: Origins and evolvability of body plans. In S. Bengston (ed.), Barly Life on Earth. Columbia University Press New York, pp. 489-500.

Raff, R. A. 1996. The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form. University of Chicago Press, Chicago.

Raff, R. A. and G. A. Wray. 1989. Heterochrony: Developmental mechanisms and evolutionary results. J. Evol. Biol. 2: 409-434.

Raff, R. A., G. A. Wray and J. J. Henry. 1991. Implications of radical evolutionary changes in early development for concepts of developmental constraint. In L. Warren and H. Korpowski (eds.), New Perspectives in Evolution. Liss/Wiley, New York, pp. 189-207.

Relaix, F. and M. Buckingham. 1999. From insect eye to vertebrate muscle: Redeployment of a regulatory network. Genes Dev. 13:3171-3178.

Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer and C. Tabin. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell 75: 1401-1416.

Riedl, R. 1978. Order in Living Systems: A Systems Analysis of Evolution. John Wiley and Sons, New York.

Rijli, F. M., M. Mark, S. Lakkaraju, A. Dierich, P. Dollé and P. Chambon. 1993. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by the disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. Cell 75:1333-1349.

Romer, A. S. 1949. The Vertebrate Body. Saunders, Philadelphia.

Romer, A. S. 1970. The Chanares (Argentina) Triassic reptile fauna VI. A chiniquodontid cynodont with an incipient squamosal-dentary jaw articulation. Breviora 344: 1-18.

Ronshaugen, M., N. McGinnis and W. McGinnis. 2002. Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. Nature 415: 914-917.

Roux, W. 1894. The problems, methods and scope of developmental mechanics.

Fuentes de las citas al comienzo de cada capítulo

Capítulo 1
Cezanne, P. Citado en J. Gasquet, 1921. *Cezanne*. Paris, pp. 79-80.

Oppenheimer, J. M. 1955. Análisis del desarrollo: problemas, conceptos y su historia. En *Analysis of Development* (Análisis del desarrollo), B. H. Willier, P. A. Weiss y V. Hamburguer (eds.). Saunders, Philadelphia, pp. 1-24.

Capítulo 2
Bonner, J. T. 1965. *Size and Cycle: An Essay on the Structure of Biology* (Tamaño y ciclo: un ensayo sobre la estructura de la biología). Princeton University Press, Princeton, NJ, p.3.

"The Circle of Life" (El círculo de la vida). Música por Elton John. Letra por Tim Rice. Copyright 1994 Wonderland Music Company, Inc. Todos los derechos reservados. Utilizado con autorización.

Capítulo 3
Bard, J. 1997. Explaining development. *Bioessays* 20: 598-599.

Morgan, T. H. 1898. "Some Problems of Regeneration" (Algunos problemas de la regeneración). Conferencias biológicas pronunciadas en el laboratorio de Biología Marina, Woods Hole, 1898, p. 207.

Capítulo 4
Brenner, S. 1979. Citado en H. F. Judson, 1979. *The Eigth Day of Creation* (El octavo día de la creación). Simon and Schuster, New York, p. 205.

Ozick, C. 1989. *Metaphor and Memory* (Metáfora y memoria). Alfred A. Knopf, New York, p. 111.

Capítulo 5
Claude, A. 1974. The coming of age of the cell. Conferencia Nobel, reimpresa en *Science* 1898:433-435.

Waddington, C. H. 1956. *Principles of Embryology* (Principios de embriología). Macmillan, New York, p. 5.

Capítulo 6
Butler, O. 1998. *Parable of the Talents* (Parábola de los talentos). Warner Books. New York, p. 3.

Harrison, R.G. 1933. Some difficulties of the determination problem. *Am. Nat.* 67:306-321.

Capítulo 7
Darwin, C. 1871. *The Descent of Man* (El antepasado del hombre). Murray, London, p. 893.

Whitman, W. 1855. "Song of Myself" (Canto de mí mismo). En *Leaves of Grass and Selected Prose* (Hojas de hierba y prosa selecta). S. Bradley (ed.), 1949. Holt, Rinehart & Winston, New York, p. 25.

Capítulo 8
Just, E. E. 1939. *The Biology of the Cell Surface* (La biología de la superficie celular). Blakiston, Philadelphia, p. 288.

Wolpert, L. 1986. *From Egg to Embryo: Determinative Events in Early Development* (Desde el huevo al embrión: acontecimientos de determinación en el desarrollo temprano). Cambridge, University Press, p. 1.

Capítulo 9
Kohler, R. E. 1994. *Lords of the Fly: Drosophila Genetics and Experimental Life* (Señores de la mosca: genética y vida experimental de *Drosophila*). University of Chicago Press, Chicago, p. 33.

Schultz, J. 1935. Aspects of the relation between genes and development in *Drosophila*. *Am. Nat.* 69:30-54.

Capítulo 10
Rostand, J. 1960. *Carnets d'un Biologiste*. Libraire Stock, Paris.

Spemann, H. 1943. *Forschung und Leben (Investigación y vida)*. Citado en T. J. Horder, J. A. Witkowski y C. C. Wylie, 1986. *A History of Embriology* (Una historia de la embriología). Cambridge Universtiy Press, Cambridge, p. 219.

Stern, C. 1936. Genetics and ontogeny. *Am. Nat.* 70:29-35.

Capítulo 11
Doyle, A. C. 1891. "A Case of Identity" (Un caso de identidad). En *The Adventures of Sherlock Holmes* (Las aventuras de Sherlock Holmes). Reimpreso en *The complete Sherlock Holmes Treasury* (La antología completa de Sherlock Holmes), 1976. Crown, New York, p. 31.

Holub, M. 1990. "From the Intimate Life of Nude Mice" (Desde la íntima vida de los ratones desnudos).En *The Dimension of the Present Moment* (La dimensión del momento actual). Traducción. D. Habova y D. Young. Faber y Faber, London, p. 38.

Capítulo 12
Levi-Montalcini R. 1988. En *Praise of Imperfection* (Elogio de la imperfección). Basic Books, New York, p. 90.

Thomas, L. 1979. "On Embriology" (Sobre embriología). En *The Medusa and the Snail* (La medusa y el caracol), Viking Press, New York, p. 157.

Capítulo 13
Ramón y Cajal, S. 1937. *Recollection of My Life* (Recuerdos de mi vida). Traducción E. H. Craigie y J. Cano. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 36-37.

Whitehead, A. N. 1934. *Nature and Life* (Naturaleza y vida). Cambridge University Press, Cambridge, p. 41.

Capítulo 14
Coleridge, S. T. 1885. *Miscellenea*. Bohn, London, p. 301

Whitman, W. 1867. "Inscriptions" (Inscripciones). En *Leaves of Grass and Selected Prose* (Hojas de hierba y prosa selecta). S. Bradley (ed.), 1949. Holt, Rinehart & Winston, New York, p. 1.

Capítulo 15
Goethe, J. W. von. 1805. *Faust* (Fausto), Parte I. Traducción R. Jarrell 1976.

Harvey, W. 1628. *Exercitio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis Animalibus*. Reimpreso en 1928, C. C. Thomas, Baltimore, p. A2.

Capítulo 16
Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species* (Sobre el origen de las especies). New American Library, New York, p. 403.

Fuentes, C. 1989. *Christopher Unborn*. Traducción A. MacAdam. Farrar, Straus, and Giroux, New York, p. 281.

Capítulo 17
Darwin, E. 1791. Citado en M.T. Ghiselin, 1974. *The Economy of Nature and the Evolution of Sex* (La economía de la naturaleza y la evo-

Índice de autores

C

F

G

H

I

J

K

L

Q

R

S

T

U

V

Z

Índice analítico

A

B

D

F

J

K

L

M

N

O

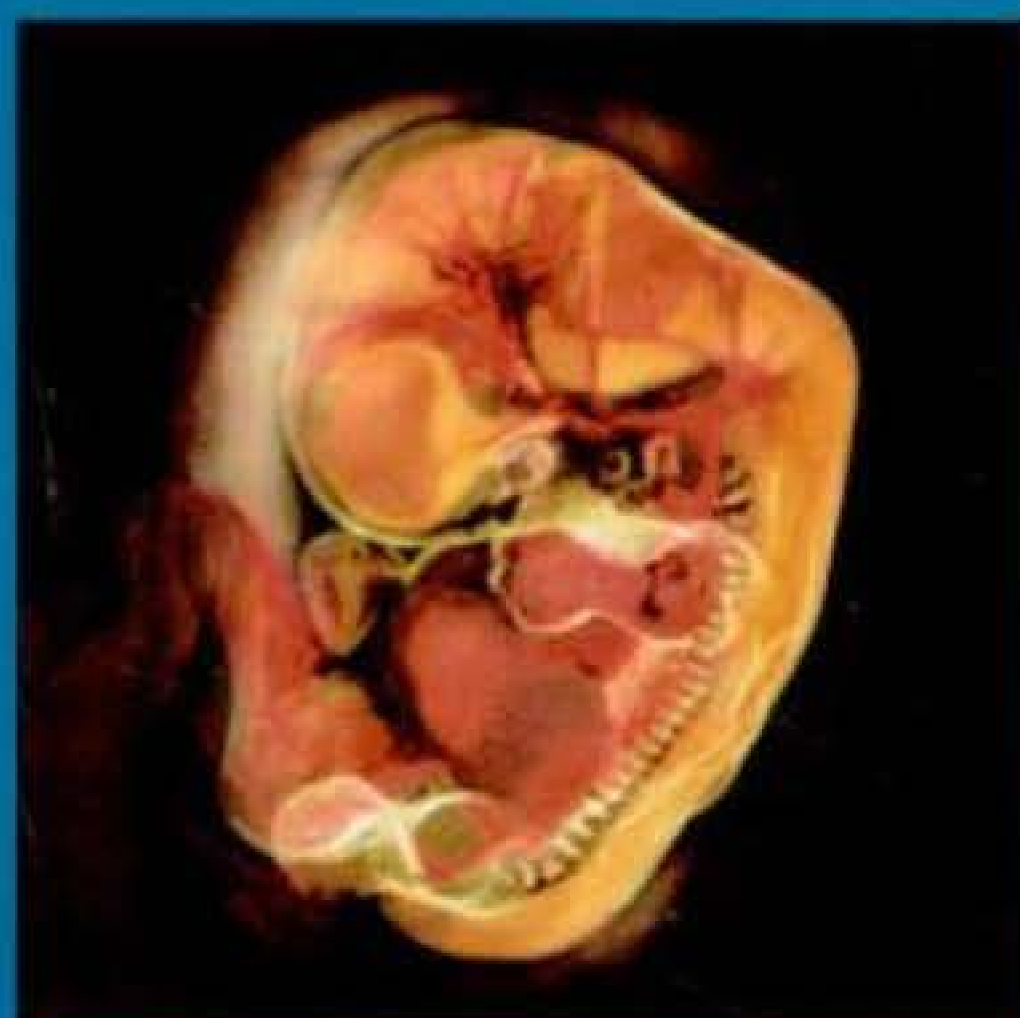
Q

R

U

V

Gilbert



Biología del Desarrollo

7.ª EDICIÓN

La biología del desarrollo puede concebirse como una imagen dinámica del desarrollo en la que se conjugan distintos aspectos provenientes de la morfología clásica y experimental, de la genética y de la biología celular. Actualmente, la riqueza y fuerza de esta integración de conocimientos está generando una nueva "síntesis" evolutiva en nuestra comprensión de los principios que rigen el desarrollo y la evolución de los seres vivos sobre la tierra.

La obra consta de cuatro partes. La primera, *Principios de la biología del desarrollo* establece las bases históricas, biológicas, genéticas y celulares de la especialidad, y destaca, en particular las modernas técnicas experimentales utilizadas y el significado esencial de la expresión génica diferencial y la comunicación intercelular. La segunda, *Desarrollo embrionario temprano* trata sobre la fecundación y el desarrollo temprano (formación del eje corporal) en modelos de invertebrados, anfibios, peces, aves y mamíferos, y establece las bases para su comparación. La tercera, *Desarrollo embrionario tardío*, aborda la derivación de órganos o partes embrionarias a partir del ectodermo, la cresta neural, el mesodermo y el endodermo, y temas más específicos (desarrollo de los miembros en tetrápodos, determinación del sexo, metamorfosis y otros procesos plásticos, formación de la línea germinal). La cuarta parte, *Ramificaciones adicionales de la biología del desarrollo*, cubre el desarrollo de las plantas, las implicaciones médicas de la biología del desarrollo, los efectos ambientales sobre el desarrollo animal y los mecanismos ontogenéticos del cambio evolutivo.

Otros aspectos destacados son:

- Todos los capítulos incluyen apartados aclaratorios denominados **"Información adicional y especulaciones"**, un resumen final de conclusiones y una extensa bibliografía.
- Gran cantidad de **ilustraciones**, en su mayoría en color y cuidadosamente seleccionadas y **fotografías** extraídas de la literatura científica más reciente.
- Un **CD-ROM** con **vade mecum²** (en inglés), una guía interactiva para el estudio de la biología del desarrollo con más de 140 videos, 300 fotografías adicionales y una **Guía para el Estudio Experimental**, un manual de laboratorio que enseña a trabajar como un investigador.
- Un sitio específico en la red (**www.devbio.com**) que complementa y enriquece la obra con perspectivas históricas, filosóficas y éticas, y películas, entrevistas y opiniones.

Un texto ideal, dimensionado hábilmente en la frontera del libro de texto y el libro de referencia, para estudiantes y profesionales que deseen ampliar su horizonte sobre los distintos aspectos de esta apasionante aventura en que se ha transformado la *Biología del desarrollo*.

ISBN: 950-06-0869-3
84-7903-912-4



EDITORIAL MEDICA panamericana